

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica



**Determinación del papel de SHOX y la vía de
señalización CNP/NPR-B/GMPc en la regulación
del crecimiento humano.**

Memoria para optar al grado de Doctor del licenciado en Biología:

Alfonso Hisado Oliva

Madrid, 2016

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



**Determinación del papel de SHOX y la vía de señalización
CNP/NPR-B/GMPc en la regulación del crecimiento
humano.**

Memoria para optar al grado de Doctor:

Alfonso Hisado Oliva
Licenciado en Biología

Director de Tesis:

Dra. Karen E. Heath

Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM)
Hospital Universitario La Paz (HULP)

Agradecimientos

Recuerdo perfectamente mi primer día en el laboratorio, justo coincidió con la defensa de tesis de Evita Barroso. Quién iba a decir a ese “chaval despistado” que hoy iba a estar escribiendo su tesis, igual de despistado. Parece que ahora sí, el final de todo esto se acerca, y después de seis años, cuatro de ellos con el doctorado, hay mucho que agradecer.

Es complicado nombrar en estas líneas a todas las personas que, de una u otra forma, me han ofrecido su ayuda para que pueda haber terminado esta tesis. Para hablar de ellos todo lo que se merecerían necesitaría otro tomo, por lo que tendré que reducir espacio. Por si acaso me quedara a alguien atrás, quiero daros las gracias a todos de forma general.

Empezaré por dar las gracias a Karen, por enseñarme el mundo de la investigación y a disfrutar con él, motivarme, tener en cuenta mis ideas y estar siempre disponible. A la vez también gracias a Ángel, por estar siempre dispuesto a ayudar y resolver cualquier duda.

A mis amigos, ya que son más que compañeros de laboratorio: Miri, primero por servirme de referente científico, enseñarme y tener la paciencia que eso implica, y segundo por las charlas absurdas sobre cualquier cosa en el desayuno, capaces de animarte en los peores días. Vero, por estar siempre disponible para ayudar y dar consejo, en lo personal y lo científico, y por las mil anécdotas que hemos vivido en el lab. Alberta, por dar siempre buenas ideas y soluciones, ayudar a ver las cosas desde otro punto de vista y ser tan buena persona. A Anito, por ser capaz de sacarte una sonrisa y animar a todo el lab, incluso en los peores momentos, por ser el buen rollo en persona y contagiárnoslo a lo demás, como te echamos de menos cuando te fuiste... A Carol, pura energía, muchas gracias por los consejos y por hacerme reír, mi sitio queda en muy buenas manos. A Sara, por toda la ayuda prestada y los consejos dados durante estos años. A Isabel, por darle al lab un toque familiar, como cuando pone los adornos de navidad o trae chocolate con churros. A Carlitos y Jimena, por las risas y las mil anécdotas e historias en los desayunos.

A todos mis estudiantes, sobre todo a Ana I, Alba y María, por ayudarme muchísimo con la tesis, hacerme reír y, sobre todo, soportarme. No tengo ninguna duda de que todo os va a ir genial.

A los chicos del laboratorio de al lado: Jair (compañero en el camino del doctorado), Pedro, Eva, Gema, Rubén e Irene. A Pablo, Sixto, Constanza, Jesús Molano, Rocío, Vicky, Lara y todos los que formais parte del INGEMM, gracias por hacerme sentir como en una gran familia.

A todos mis amigos, Buzo, Torre, Mansi, Maher, Fer, Yeyo y Manu, porque siempre habeís estado ahí, para celebrar en los momentos buenos y para animar en los malos. También a Pope e Ivi, amigos desde que tengo uso de razón.

Como no podía ser de otra manera, también tengo mucho que agradecer a mi familia, que son los culpables de que ahora sea lo que soy. A mi tío Jose, por sus consejos, se que si siempre me ha atraído la ciencia es en parte por tu culpa. A mi tita, que decirla, gracias por ser una segunda madre para mí, por cuidarme y enseñarme. A mis primos, que son como hermanos para mí. A Jose, por cuidar de mi familia y convertirse en parte importante de ella. A mi hermano Jorge, por tener siempre un video de youtube listo para animarme y por ser así de buena persona, y al pequeño Néstor por llenar aún más de vida la familia, os quiero mucho a los dos. A mis abuelos Sofía y Jesús por criarme y educarme, ojalá pudierais estar hoy aquí.

Vero, por estar siempre ahí, por aguantarme en los momentos de tensión y darme tu apollo, porque a pesar de ser la persona que más ha sufrido esta tesis nunca te quejaste, sino que siempre me animaste a seguir y me diste fuerza. Por hacerme mejor persona y darme miles de momentos felices durante estos ocho años. Como no, a Darwin, porque alguna de las ideas de la tesis, se me ocurrieron con él de paseo.

Por último dar las gracias a mi madre, por todo, por apoyarme de forma incondicional, ayudarme a tomar decisiones, por ser un espejo en el que mirarse y aprender a ser fuerte y subreponerme a las circunstancias. Por trabajar muy duro para que yo pudiera estudiar una carrera y acabar aquí, se que si soy algo en la vida es gracias a tí, te quiero mamá.

Resumen

El gen *SHOX* codifica un factor de transcripción involucrado en el desarrollo esquelético. Defectos en este gen o en sus regiones reguladoras dan lugar a dos displasias esqueléticas: la displasia mesomélica de Langer (DML) y la discondrosteosis de Léri-Weill (DLW), y a un pequeño porcentaje de pacientes con talla baja idiopática (TBI). Aproximadamente un 70% de los pacientes diagnosticados con DLW presentan alteraciones en *SHOX* o sus regiones reguladoras, mientras que el 30% restante no tiene defecto molecular conocido, por lo tanto, otros *loci* podrían estar implicados en esta patología.

Estudios previos han observado que *SHOX* y su parólogo, *SHOX2*, son capaces de regular la expresión de *Agc1*, un gen característico de la matriz extracelular de cartílago (MEC), a través del trío SOX. En esta tesis, utilizando las técnicas de luciferasa, PCR cuantitativa y ratones *knock-out*, hemos demostrado que *SHOX* y *SHOX2* son capaces de regular la expresión de muchos más genes relacionados con la MEC y la condrogénesis, concretamente de *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100A1*. Por otro lado, hemos llevado a cabo una búsqueda de mutaciones en las regiones reguladoras de *SHOX* del promotor de *MATN1*, en dos cohortes de 272 pacientes con sospecha de DLW y 95 con TBI, sin defectos en *SHOX*. Hemos encontrado un cambio, c.-199C>T en un paciente con sospecha de DLW, y hemos demostrado su patogenicidad.

Se ha visto que pacientes con mutaciones en la ruta del péptido natriurético tipo C (CNP)/receptor del péptido natriurético tipo B (NPR-B) / GMP cíclico (GMPc) presentan un fenotipo parecido al causado por defectos en *SHOX*. Defectos en homocigosis en *NPR2* que codifican el receptor NPR-B dan lugar a la displasia acromesomélica de tipo Maroteaux, muy similar a la DML, mientras que defectos en heterocigosis en *NPR2* dan lugar a talla baja. Hemos llevado a cabo una búsqueda de mutaciones en *NPR2* y *NPPC* en una cohorte de pacientes con sospecha de DLW (n=272) y TBI (n=95). Como resultado, hemos encontrado nueve variantes en *NPR2*, de las que se confirmó la patogenicidad de siete, mediante ensayos de actividad GMPc y localización celular. Posteriormente, descubrimos la implicación de un nuevo gen en talla baja humana, *NPPC* que codifica CNP, el ligando de NPR-B, mediante la identificación de dos mutaciones sin sentido en dos familias con talla baja y acortamiento de manos.

En conclusión, esta tesis ha contribuido a aumentar el conocimiento acerca de *SHOX* y la DLW, incluyendo el descubrimiento de posibles nuevas dianas terapéuticas.

Summary

SHOX encodes a transcription factor involved in skeletal development. Defects in this gene or its regulatory regions are associated with two skeletal dysplasias: Langer mesomelic dysplasia (LMD) and Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD), and a small percentage of patients with idiopathic short stature (ISS). Approximately 70% of LWD patients have defects in *SHOX* or its regulatory regions, whilst the molecular defect in the remaining 30% remains unknown, therefore other *loci* may be implicated in this pathology.

Previous studies demonstrated that *SHOX* and its paralog, *SHOX2*, are able to regulate *Agc1* expression, an extracellular matrix (ECM) gene, through its interaction with the SOX trio. Using luciferase reporter assays, quantitative PCR and knock-out mice techniques, we demonstrated that *SHOX* and *SHOX2* are able to regulate the expression of several ECM genes, specifically *Comp*, *Matn1* and two other genes implicated in chondrogenesis, *miR-140* y *S100A1*. We also undertook a mutation screening of *SHOX* regulatory regions in the *MATN1* promoter in 272 patients with suspected LWD and 95 with ISS, in which *SHOX* defects had been previously excluded. We found one variant, c.-199C>T, which we subsequently demonstrated to be pathogenic.

Patients with mutations in C-natriuretic peptide (CNP) / Natriuretic peptide receptor B (NPR-B) / cGMP present phenotypes similar to those with *SHOX* alterations. Homozygous mutations in *NPR2*, which encodes for NPR-B, lead to Acromesomelic dysplasia, Maroteaux type (AMDM), clinically similar to LMD, whilst heterozygous *NPR2* mutations lead to short stature. We screened for mutations in *NPR2* and its ligand CNP (*NPPC* gene) in 272 patients with suspected LWD and 95 with ISS. Nine *NPR2* variants were identified, seven of which were determined to be pathogenic using cGMP activity and subcellular localization assays. We also demonstrated the implication of *NPPC* in human short stature through the identification of two missense mutations in two families with short stature and small hands.

In conclusion, these results have contributed to our knowledge about *SHOX* and LWD, including the characterization of possible new therapeutic targets.

Abreviaturas

10T1/2	Células mesenquimales C3H/10T1/2
ACH	Acondroplasia
Actb	Actina tipo β
AD	Autosómico dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico codificante
AER	Cresta ectodérmica apical (<i>Apical Ectodermal Ridge</i>)
Agc1	Agrecano
ANP	Péptido natriurético atrial (<i>Atrial natriuretic peptide</i>)
Ant-Post	Eje antero-posterior
AR	Autosómico recesivo
ARN	Ácido ribonucleico
Auto	Autopodio
BMPs	Proteínas morfogénicas ósea (<i>Bone Morphogenic Proteins</i>)
BNP	Péptido natriurético tipo B (<i>B-Natriuretic peptide</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CALR	Calreticulina
Cl	Clavícula
CNP	Péptido natriurético tipo C (<i>C-natriuretic peptide</i>)
Col-	Colágeno
COMP	Proteína oligomérica de la matriz de cartílago (<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>)
Cop	Centro de osificación primario
Cos	Centro de osificación secundario
COS-7	<i>African Green Monkey Cercopithecus aethiops Fibroblast-like Kidney Cells</i>
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo (<i>Connective Tissue Growth Factor</i>)
Cu	Cúbito
DAMM	Displasia acromesomélica, tipo Maroteaux
DAPI	Diamino-2-fenilindol
DE	Desviaciones estándar
DLW	Discondrosteosis de Léri-Weill
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DML	Displasia mesomélica de Langer
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
ER-α	Receptor de estrógenos α (<i>Estrogen receptor α</i>)

Es	Escápula
Estilo	Estilopodio
E/T	Proporción Envergadura/Talla
ExAc	Base de datos del <i>Exome Aggregation Consortium</i>
FBS	Suero Fetal Bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FGFs	Factores de crecimiento de fibroblastos (<i>Fibroblast growth factors</i>)
FGFRs	Receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (<i>Fibroblast growth factor receptors</i>)
GCs	Glucocorticoides
GH	Hormona de crecimiento (<i>Growth hormone</i>)
GHR	Receptor de la Hormona de crecimiento (<i>Growth hormone receptor</i>)
GHRH	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (<i>Growth hormone releasing hormone</i>)
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (<i>Genome-wide association study</i>)
HCH	Hipocondroplasia
HD	Homeodominio
HDAC4	Histona deacetilasa- 4
Hoxa	<i>Homeobox</i>
HRM	Análisis de fusión de alta resolución (<i>High Resolution Melting</i>)
Hu	Húmero
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo I (<i>Insulin growth factor I</i>)
IGF-IR	Receptor de IGF-I (<i>Insulin growth factor I receptor</i>)
IGFBP-3	Proteína de unión a IGF-I (<i>Insulin growth factor I binding protein 3</i>)
IGFALS	Unidad ácido-lábil de IGF-I (<i>Insulin growth factor I acid labile subunit</i>)
Ihh	Proteína IHH (<i>Indian hedgehog</i>)
IMC	Índice de masa corporal
INGEMM	Instituto de Genética Médica y Molecular
LB	Medio de crecimiento rico de E.coli (Lysogeny Broth)
Lbab	<i>Long bone abnormality</i> (ratón)
LINE	Secuencias <i>long interspersed elements</i>
L-Sox5	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 5</i> isoforma larga
MAPKs	Proteínas quinasa activadas por mitógenos (<i>Mitogen-Activated protein Kinases</i>)
Matn	Matrilina
MEC	Matriz extracelular
Meis1/2	<i>Meis homeobox 1, -2</i>
MEK1/2	MAP quinasa quinasa 1, -2 (<i>Mitogen-Activated protein Kinase Kinase 1, -2</i>)
miR-145	micro ARN-145
miR-140	micro ARN-140

MLPA	Amplicificación de sondas dependiente de ligamiento múltiple (<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
MMPs	Metaloproteasas de la matriz (<i>Matrix Metalloproteases</i>)
N-CAM	Molécula de adhesión celular neuronal (<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>)
ND	No determinado
NI	No informativo
Nog	<i>Noggin</i>
NPPC	Gen del Precursor del péptido natriurético tipo C (<i>Natriuretic peptide precursor C</i>)
NPPB	Gen del Precursor del péptido natriurético tipo B (<i>Natriuretic peptide precursor B</i>)
NPR2	Receptor del péptido natriurético tipo 2 (<i>Natriuretic peptide receptor 2</i>)
NPRs	Receptores del péptido natriurético (<i>Natriuretic peptide receptors</i>)
OAR	Dominio <i>Otp</i> , <i>Aristaless</i> , <i>Rax</i>
p38	p38 MAP quinasa (<i>p38 MAP Kinase</i>)
PAR1	Región pseudoautosómica 1 (<i>Pseudoautosomal region 1</i>)
PAX5	Proteína PAX5 (<i>Paired box 5</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Pc	Placa de crecimiento
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído
PLB	Tampón de lisis pasiva (<i>Passive Lysis Buffer</i>)
PRKGs	Proteína quinasas
Prrx1	Proteína Prrx1 (<i>Paired related homeobox 1</i>)
Prox-Dist	Eje proximal-distal
PTHrP	Proteína relacioanda con la hormona paratiriodea (<i>Parathyroid Hormone-related Protein</i>)
Ra	Radio
RA	Ácido retinoico (<i>Retinoic Acid</i>)
RAF	Proteína RAF (<i>Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>)
RE	Retículo endoplasmático
rhCNP	CNP recombinante humano, BMN-111 (<i>Recombinant Human CNP</i>)
rhGH	Hormona de crecimiento humana recombinante (<i>Recombinant Human Growth Hormone</i>)
Runx2	Factor de transcripción relacionado con Runt 2 (<i>Runt-related tanscription factor 2</i>)
S100A1	Proteína S100A1 (<i>S100 Calcium Binding Protein A1</i>)
S100B	Proteína S100B (<i>S100 Calcium Binding Protein B</i>)
SHH	Proteína SHH (<i>Sonic Hedgehog</i>)
SHOX	Proteína SHOX (<i>Short stature homeobox containing protein</i>)
SHOX2	Proteína SHOX2 (<i>Short stature homeobox containing protein 2</i>)
SN	Síndrome de Noonan
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>single nucleotide polimorfism</i>)
SNVs	Variantes de nucleotide único (<i>Single nucleotide variants</i>)

Sox9	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9</i>
Sox5	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 5</i>
Sox6	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 6</i>
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
SST	Somatostatina
STAT	Proteína STAT (<i>Signal transducer and activator of transcription</i>)
Tbp	Proteína de unión a TATA (<i>TATA box binding protein</i>)
TBI	Talla baja idiopática (<i>idiopathic short stature, ISS</i>)
TD	Displasia tanatofórica
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
TH	Hormona tiroidea (<i>Thyroid Hormone</i>)
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TS/T	Proporción Talla sentado/Talla
U2OS	Línea celular de osteosarcoma humano (<i>Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VV	Vector vacío
Wnt	Proteína Wnt (<i>Wingless-type</i>)
WT	Fenotipo Silvestre (<i>Wild type</i>)
ZPA	Zona de actividad polarizante (<i>Zone of Polarizing Activity</i>)
Zeugo	Zeugopodio

Índice

Introducción	39
1. Crecimiento y desarrollo	41
2. Desarrollo de las extremidades.	41
3. Los huesos y el esqueleto.....	42
3.1. Estructura de los huesos largos.	42
3.2. Formación de los huesos.	43
3.2.1. Osificación intramembranosa.	43
3.2.2. Osificación endocondral.	43
4. Condrogénesis.....	44
4.1. Matriz Extracelular (MEC) de Cartílago.	46
5. Placa de crecimiento.	47
5.1. Zonas de la placa de crecimiento.	47
5.2. Regulación de la placa de crecimiento.....	48
5.2.1. Regulación endocrina.....	48
5.2.1.1. GH (Hormona de crecimiento) e IGF-I (Factor de crecimiento insulínico tipo I).....	48
5.2.1.2. GCs (Glucocorticoides).	50
5.2.1.3. Hormonas Tiroideas.	50
5.2.1.4. Estrógenos.	50
5.2.1.5. Andrógenos.....	50
5.2.2. Regulación paracrina.	50
5.2.2.1. FGFs (Factores de crecimiento de fibroblastos).	51
5.2.2.2. BMPs (<i>Bone Morphogenic Proteins</i>).	51
5.2.2.3. Ihh (<i>Indian Hedgehog</i>) y PTHrP (<i>Parathyroid Hormone-related Protein</i>).	51
5.2.2.4. Rutas de señalización de Wnt (<i>Wingless-type</i>).	52
5.2.2.5. CNP/NPR-B/GMPc (péptido natriurético tipo C / receptor del péptido natriurético-B / Guanosin monofosfato cíclico).....	52
5.2.2.5.1. Péptido natriurético tipo C (CNP).....	52
5.2.2.5.2. NPR-B (Receptor del péptido natriurético tipo B).....	53
5.2.3. Regulación epigenética y micro ARNs.	54
5.2.3. Factores de transcripción.	55

5.2.3.1. Trío SOX.	55
5.2.3.2. SHOX y SHOX2 (<i>Short stature homeobox containing gene 2</i>).	56
6. SHOX (<i>Short stature Homeobox</i>).	56
6.1. Patologías asociadas a SHOX.	57
6.1.1. Discondrosteosis de Léri-Weill (DLW).	57
6.1.2. Displasia mesomélica de langer (DML).	58
6.1.3. Talla baja idiopática (TBI).	59
6.2. SHOX2 (<i>Short stature homeobox 2</i>).	59
6.3. Dianas transcripcionales de SHOX.	60
6.4. Antecedentes previos a nuestra investigación.	61
Hipótesis	63
Objetivos	67
Materiales y Métodos	71
1. Cultivos celulares.....	73
2. Pacientes.	73
3. Muestras control de ADN.	74
4. Modelos animales (ratones).	74
5. Cultivos de Micromasas.....	75
6. Plásmidos.	75
6.1 Clonación.	76
6.2 Subclonación.....	77
6.3 Mutagénesis.	77
7. Transfección.....	78
8. Ensayo de Luciferasa.	78
9. PCR cuantitativa.	79
10. Hibridación <i>in situ</i>	79
10.1 Preparación de los cortes histológicos.	79
10.2 Obtención de las sondas de ARNm antisentido.	80

10.3 Hibridación <i>in situ</i>	80
11. Búsqueda de mutaciones.....	81
11.1 Extracción de ADN.....	81
11.2 <i>High Resolution Melting</i> (HRM).	81
11.3 Secuenciación Sanger.	81
11.4 Next generation sequencing (NGS).	82
12. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).	82
13. Inmunocitoquímica.	82
14. Herramientas bioinformáticas.	83
14.1 Análisis de la patogenicidad <i>in silico</i>	83
14.2 Estudios de frecuencias poblacionales.....	84
14.1 Análisis estadísticos.....	84
Resultados	87
1. Implicación de SHOX y SHOX2 en la regulación de la formación de la matriz extracelular de cartílago.	89
1.1. Estudio del papel de SHOX y SHOX2 en la regulación de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100A1</i> de forma directa.....	89
1.1.1 Estudio de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100A1</i>	89
1.1.2 Análisis de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión endógena de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> , <i>S100A1</i> y <i>Agc1</i>	89
1.2 Caracterización del papel de <i>Shox2</i> en la regulación de la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>miR-140</i> , <i>S100a1</i> y <i>Agc1</i> , <i>in vivo</i>	90
1.2.1 Análisis de la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100a1</i> en cultivos de micromasa con células de extremidades en desarrollo de ratón.....	91
1.2.2 Estudio del patrón de expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> y <i>Agc1</i> , en extremidades en desarrollo de ratones <i>knock-out</i> de <i>Shox2</i>	92
1.3 Análisis del papel de SHOX y SHOX2 en la regulación de la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100A1</i> a través del trío SOX (forma indirecta).	93
1.3.1 Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100A1</i> a través del trío SOX.	93

1.3.2	Análisis de la capacidad de SHOX de regular la expresión endógena de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> , <i>S100A1</i> y <i>Agc1</i> , a través del trío SOX.....	95
1.4	Análisis del papel de SHOX en la regulación de la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100A1</i> a través de BMP.....	95
1.4.1	Estudio de la capacidad de BMP2 de regular la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100A1</i>	95
1.4.2	Estudio de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100A1</i> , a través de BMP.	97
1.5	Análisis de la capacidad de SHOX de regular la expresión durante la condrogénesis.	99
1.5.1	Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión de <i>Comp</i> , <i>Matn1</i> , <i>Col2a1</i> , <i>Agc1</i> , <i>miR-140</i> y <i>S100a1</i> durante la condrogénesis.	100
1.5.2	Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión de <i>Bmp2</i> y <i>Bmp4</i> durante la condrogénesis.....	101
1.6	Profundización en el estudio del papel de SHOX en la regulación de la expresión de <i>Matn1</i> . ..	102
1.6.1	Confirmación de la capacidad de SHOX de regular la expresión de <i>Matn1</i> de forma dire.	102
1.6.2	Delimitación de la región de regulación de SHOX en el promotor de <i>Matn1</i>	103
1.6.3	Análisis de la capacidad de SHOX de regular la expresión del promotor de <i>MATN1</i> hum.	103
1.7	Búsqueda de defectos en el promotor de <i>MATN1</i> en una cohorte de pacientes con DLW.	106
1.7.1	Análisis funcional del cambio c.-199C>T, encontrado en el promotor de <i>MATN1</i>	106
2.	Búsqueda de mutaciones en el eje <i>NPPC/NPR2</i> /GMPc en pacientes con sospecha de DLW o TBI	109
2.1	Búsqueda de variantes en <i>NPR2</i> en pacientes con DLW o TBI.....	109
2.1.1	Variante c.491C>G de <i>NPR2</i> (probando 1).	109
2.1.2	Variante c.766G>T de <i>NPR2</i> (probando 2).	111
2.1.3	Variante c.1262C>T de <i>NPR2</i> (probando 3).....	112
2.1.4	Variante c.1636A>T de <i>NPR2</i> (probandos 4 y 5).....	113
2.1.5	Variante c.1641_1643del de <i>NPR2</i> (probando 6).	114
2.1.6	Variante c.1928G>A de <i>NPR2</i> (probando 7).	115
2.1.7	Variante c.2455C>T de <i>NPR2</i> (probando 8).....	116
2.1.8	Variante c.2972A>G de <i>NPR2</i> (probando 9).	117
2.1.9	Variante c.3058C>T de <i>NPR2</i> (probando 10).....	118
2.2	Caracterización funcional de las variantes encontradas en <i>NPR2</i>	119
2.2.1	Estudio de la localización intracelular de las variantes encontradas en <i>NPR2</i>	119

2.2.2	Análisis de la actividad guanilato ciclasa de las variantes de NPR-B encontradas.	120
2.2.3	Análisis de la capacidad de BNP de activar NPR-B.	120
2.3	Búsqueda de variantes en <i>NPPC</i> en pacientes con DLW y TBI.	123
2.3.1	Variante c.349C>G de <i>NPPC</i> (probando 11).	123
2.3.1	Variante c.355G>T de <i>NPPC</i> , encontrada por un grupo colaborador (probando 12).	124
2.3.2	Caracterización funcional de los cambios p.Arg117Gly y p.Gly119Cys, encontrados en <i>NPPC</i>	126
2.3.3	Caracterización de los niveles de CNP y GMPc en pacientes portadores del cambio c.349C>G.	127
Discusión		131
1.	Implicación de SHOX y SHOX2 en la regulación de la formación de la matriz extracelular de cartílago.	133
1.1.	Papel llevado a cabo por SHOX en la regulación de la MEC de cartílago.	133
1.2.	Papel llevado a cabo por SHOX2 en la regulación de la MEC de cartílago.	134
1.3.	Capacidad de SHOX de regular la expresión a través BMP2.	135
1.4.	Características de la activación del promotor de <i>MATN1</i> por parte de SHOX.	136
1.5.	Teorías sobre el papel de SHOX y SHOX2 en la regulación de la expresión de proteínas características de la MEC de cartílago.	138
2.	Búsqueda de mutaciones en <i>NPR2</i> y <i>NPPC</i> en pacientes con sospecha de DLW o TBI.	139
2.1.	Búsqueda de defectos en <i>NPR2</i> (receptor del péptido natriurético 2).	139
2.1.1.	Características de los defectos encontrados en <i>NPR2</i>	139
2.1.2.	Capacidad de BNP de activar NPR-B.	141
2.1.3.	Tratamiento con hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH) en pacientes con defectos en <i>NPR2</i>	142
2.2	Búsqueda de defectos en <i>NPPC</i> (precursor del péptido natriurético tipo C).	142
2.3.	Teorías sobre la relación entre SHOX y la vía CNP/NPR-B/GMPc.	144
Conclusiones		149

Conclusions	155
Referencias	161
Anexo I	187
Anexo II	203

Introducción

1. Crecimiento y desarrollo.

El crecimiento y el desarrollo son dos fenómenos complejos paralelos interrelacionados, solo separables en su definición. Entendemos por crecimiento al aumento en el número y el tamaño de las células de un individuo, que provoca un aumento de su masa corporal. El desarrollo consiste en la adquisición de nuevas funciones debido a un aumento de la complejidad bioquímica y fisiológica de las células, tejidos y sistemas que componen el individuo. Ambos procesos pasan por una serie de etapas no uniformes: 1) Intrauterina, cuando se forman las distintas estructuras del organismo y se alcanza la máxima velocidad de crecimiento en la vida de un individuo; 2) Neonatal, desde el nacimiento hasta los tres años de edad, caracterizada por una disminución de la velocidad de crecimiento; 3) Escolar, desde los tres años hasta la adolescencia, donde se mantiene la velocidad de crecimiento y; 4) Puberal, en la que se da un aumento de la velocidad de crecimiento acompañado de la correspondiente maduración sexual. El proceso culmina al final de la pubertad, durante la cual se alcanza la madurez en los aspectos físico, psicosocial y reproductivo. Ambos procesos están altamente regulados por factores genéticos, hormonales, factores de crecimiento, el entorno y la nutrición.

2. Desarrollo de las extremidades.

Las extremidades de los vertebrados se forman a partir de primordios situados a los flancos del embrión, que están formados a su vez por una capa de tejido ectodérmico, en cuyo interior se encuentran células indiferenciadas de origen mesodérmico. Los primordios crecen en dirección distal dando lugar, de forma gradual, a las tres estructuras óseas que forman las extremidades: el estilopodio (húmero y fémur), el zeugopodio (cúbito y radio, y tibia y peroné) y el autopodio (manos y pies). Esta disposición es común a todos los vertebrados (Fig. 1).

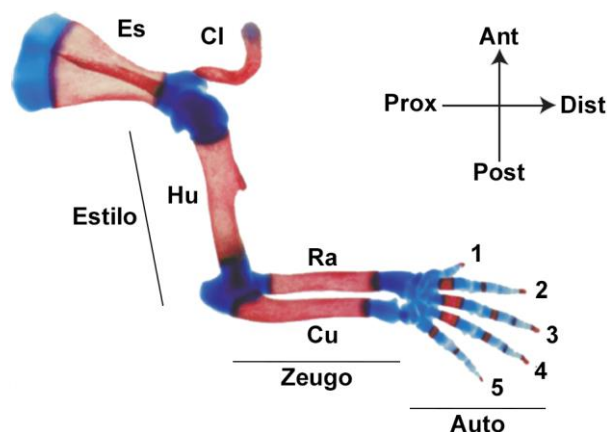


Figura 1. Morfología de los elementos óseos de las extremidades de los vertebrados. Preparación de las extremidades superiores de un ratón al nacer. La tinción azul alcian (azul) tiñe el cartilago, mientras que el rojo de alzarina (rojo) tiñe el hueso. Los ejes antero-posterior (Ant-Post) y proximo-distal (Prox-Dist) aparecen indicados. (Es) escápula, (Cl) clavícula, (Hu) húmero (estilopodio (Estilo)) y (Ra) Radio y (Cu) Cúbito (zeugopodio (Zeugo)). Los diferentes dígitos aparecen señalados con números del 1 al 5 (autopodio (Auto)). Imagen extraída de Cobb et al. 2006.

El proceso de formación de las extremidades está regulado por la cresta ectodérmica apical (*Apical Ectodermal Ridge*, AER) situada en el extremo distal de las extremidades (Fig. 2A). La AER crea una señal que difunde por todo el primordio en forma de gradiente, gracias a la expresión de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs). Por ejemplo, *Fgf8*, que es expresado en primer lugar, da la información necesaria para la formación de los diferentes segmentos de las extremidades (Moon y Capecchi 2000; Sun et al. 2002), mientras que FGF9 promueve la expansión progresiva en dirección

distal (Mariani et al. 2008). Por otro lado, en la región proximal, se expresa ácido retinoico (RA) que difunde a lo largo de todo el primordio creando un gradiente opuesto a la señal de la AER (Fig. 2B) (Mercader et al. 2000).

Las células que se encuentren bajo la influencia de la AER permanecerán indiferenciadas. A medida que los primordios vayan creciendo, las células mesenquimales de las regiones proximales dejarán de estar bajo el control de la AER y pasarán a estar influenciadas por el RA, que provocará cambios en la expresión de factores de transcripción que promueven la diferenciación hacia condrocitos y la formación de los tres elementos, por ejemplo, *Meis1/2* (*Meis homeobox 1, -2*) en el estilopodio, *Hoxa11* (*Homeobox A11*) en el zeugopodio y *Hoxa13* (*Homeobox A13*) en el autopodio (Tabin y Wolpert 2007) (Fig. 2B).

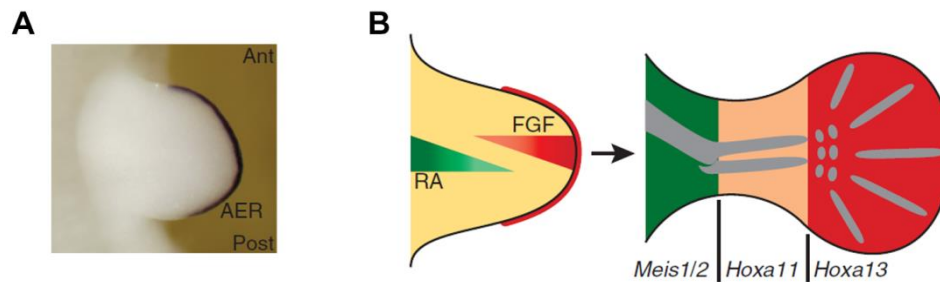


Figura 2. Morfogénesis de las extremidades de los vertebrados. (A) Visualización de la AER gracias a la detección *in situ* de transcritos de *Fgf8* de una extremidad en desarrollo de ratón. (B) Modelo del doble gradiente. En la región proximal se expresará RA y en la distal *FGFs* creando gradientes opuestos. La integración de ambas señales en el espacio y el tiempo determinará el destino de las células mesenquimales indiferenciadas. Los dominios de expresión de *Meis1/2*, *Hoxa11* y *Hoxa13* darán lugar a los tres elementos que componen las extremidades. Imágenes extraídas de Bénazet y Zeller 2009.

El desarrollo del eje anteroposterior (AP) de las extremidades viene determinado por la zona de actividad polarizante (*Zone of Polarizing Activity*, ZPA), que se encuentra en la región posterior de los primordios en desarrollo (Tickle et al. 1975). Las células de la ZPA sintetizan SHH (*Sonic Hedgehog*) que actúa como señal morfo-reguladora de la diferenciación del eje antero-posterior (Riddle et al. 1993).

3. Los huesos y el esqueleto.

Los huesos son estructuras firmes, duras y resistentes, que forman parte del esqueleto de los vertebrados, actúan como soporte de los tejidos blandos y protegen los órganos vitales. El principal tejido que lo compone es el tejido óseo, un tipo de tejido conjuntivo especializado, formado por células y por matriz ósea, que es materia extracelular calcificada rica en iones fosfato y calcio. Las células que lo forman son: osteocitos, que se localizan dentro de las cavidades o lagunas en el interior de la matriz; los osteoblastos, productores de la parte orgánica de la matriz; y los osteoclastos, que reabsorben el tejido óseo y participan en los procesos de remodelación de los huesos. Las superficies internas y externas de los huesos están recubiertas por células osteogénicas y por tejido conjuntivo que dan lugar al endostio y el periostio, respectivamente (Fig. 3).

3.1. Estructura de los huesos largos.

Los huesos largos tienen una región central llamada diáfisis y dos regiones en los extremos llamadas epífisis. Entre la diáfisis y las epífisis se encuentran las metáfisis (Fig. 3). La diáfisis presenta una estructura externa cubierta de hueso compacto (láminas), en su interior existe un canal medular que

contiene la médula ósea amarilla y que está recubierto por el endostio. En las epífisis, el hueso esponjoso (travéculas) es muy abundante, en ella se encuentra la médula ósea roja. Los extremos de los huesos largos dan lugar a las articulaciones, que están recubiertas por una capa de tejido cartilaginoso llamada cartílago auricular (Fig. 3).

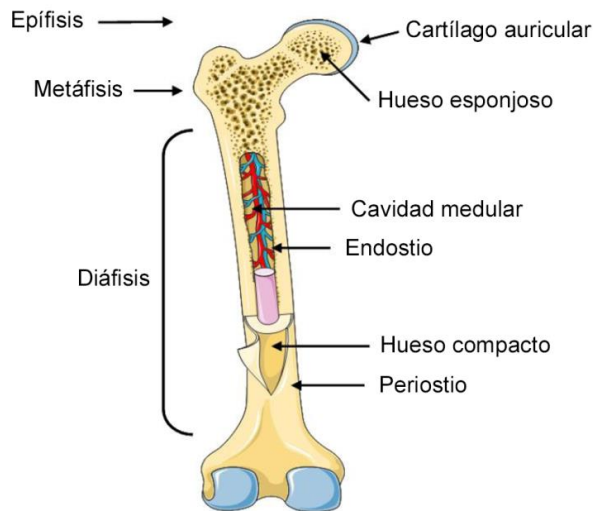


Figura 3. Esquema de un hueso largo. Los huesos largos se dividen en tres partes: la diáfisis, situada en el centro del hueso; la epífisis, situada en los dos extremos; y la metáfisis, situada entre la diáfisis y las dos epífisis. Están rodeados por dos membranas, el endostio y el periostio.

3.2. Formación de los huesos.

El tejido óseo se forma a partir de dos procesos: la osificación intramembranosa y la osificación endocondral.

3.2.1. Osificación intramembranosa.

Mediante este proceso se forman los huesos planos del esqueleto, como son el cráneo, el omóplato y el esternón, también contribuye al crecimiento de los huesos cortos y al aumento de grosor de los huesos largos. El proceso comienza cuando, en una capa conjuntiva, se forma un centro de osificación primario. En él, células mesenquimales se diferencian directamente a osteoblastos, que comienzan a sintetizar el osteoide (matriz que todavía no está mineralizada), que será posteriormente mineralizada. El centro de osificación primario sufrirá un crecimiento radial sustituyendo la capa conjuntiva preexistente.

3.2.2. Osificación endocondral.

Es el mecanismo que permite la formación de los huesos largos, se inicia a partir de un molde de cartílago preexistente, que procede de la diferenciación de las células mesenquimales provenientes del mesodermo, las cuales condensan y diferencian en condrocitos, formando la matriz extracelular (MEC) de cartílago, este proceso recibe el nombre de condrogénesis. Los condrocitos de la región central de la diáfisis proliferan y entran en un proceso complejo de maduración hipertrófica que provocará su muerte por apoptosis, y que conlleva la destrucción y mineralización de la matriz cartilaginosa, que será sustituida por tejido óseo. Las cavidades previamente ocupadas por los condrocitos son invadidas por capilares sanguíneos y células osteogénicas procedentes del tejido conjuntivo adyacente formando el centro de osificación primario. Estas células se diferencian en osteoblastos, que depositan matriz ósea sobre la matriz de cartílago calcificada (Fig. 4A).

El primer tejido óseo que aparece en los huesos largos se forma mediante osificación intramembranosa del pericondrio que recubre la parte media de la diáfisis, y da lugar al collar óseo. De aquí parten los vasos sanguíneos que se introducen en la matriz mineralizada de cartílago, arrastrando consigo células osteoprogenitoras.

El centro de osificación primario se extenderá en dirección longitudinal junto con el collar óseo, invadiendo el molde de cartílago. Posteriormente, se formarán los centros de osificación secundarios, que aparecen en cada epífisis. Estos centros son semejantes al primario, pero se expanden de forma radial, en lugar de longitudinal. En las metáfisis, entre el centro de osificación primario y los secundarios, queda un remanente de cartílago que recibe el nombre de placa de crecimiento, que desaparece al final del desarrollo puberal, cuando el individuo alcanza su talla final (Fig. 4B).

4. Condrogénesis.

La condrogénesis es el proceso que da lugar a la formación de cartílago y permite la creación del molde cartilaginoso que será sustituido por tejido óseo durante la osificación endocondral. En los elementos esqueléticos de cada miembro se producirá una proliferación y condensación de las células mesenquimales precondrocíticas que lo forman. Después se diferenciarán a condrocitos formando nódulos de cartílago en el centro de cada elemento. Los condrocitos diferenciados proliferarán y entrarán en hipertrofia. Por último, se producirá la sustitución del tejido cartilaginoso por tejido óseo.

Antes de la condensación, las células precondrocíticas comienzan a producir MEC rica en hialuronano, colágeno tipo I y tipo II (Sandell et al. 1994), que también contendrá tenascinas y trombospodinas como COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*) (Murphy et al. 1999). La iniciación de la condensación está asociada con un aumento de la actividad hialuronidasa y de la presencia de moléculas de adhesión celular, como N-cadherina y N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), que desaparecerán durante su diferenciación progresiva. (Fig. 4A).

Las células precondrocíticas prosiguen su diferenciación hacia condrocitos y continúan sintetizando matriz extracelular característica de cartílago, que contiene grandes cantidades de colágenos tipo II (Col2a1), IX (Col9a1) y XI (Col11a1), y agrecano (Agc1). El factor de transcripción Sox9 (*SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9*) es uno de los primeros marcadores expresados durante la condensación y es necesario para la expresión de *Col2a1* (Lefevre et al. 2001). Otros miembros de la familia Sox, L-Sox5 y Sox6 (*SRY (Sex Determining Region Y)-Box 5 y 6*), no están presentes en la etapa de condensación de las células mesenquimales, pero se coexpresan con Sox9 durante el resto de la diferenciación de condrocitos (Lefebvre et al. 1998). Sox9, L-Sox5 y Sox6 forman el trío SOX, que es un elemento esencial de la condrogénesis, ya que tiene la capacidad de inducir y guiar el proceso de diferenciación (Akiyama et al. 2002; Ikeda et al. 2004; Smits et al. 2004), mediante la regulación de la expresión de varios genes relacionados, como *Col2a1*, *Agc1*, *Matn1* (*Matrilina-1*), etc. (Lefebvre et al. 1998; Smits et al. 2001; Rentsendorj et al. 2005). Otro factor importante en la condrogénesis es Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*), que se localiza en los condrocitos prehipertrofos y en menor medida en los hipertrofos, donde regula las últimas fases de hipertrofia, induciendo la expresión de *Ihh* (*Indian hedgehog*) (Kim et al. 2001; Komori et al. 1997; 2005) (Fig. 4A).

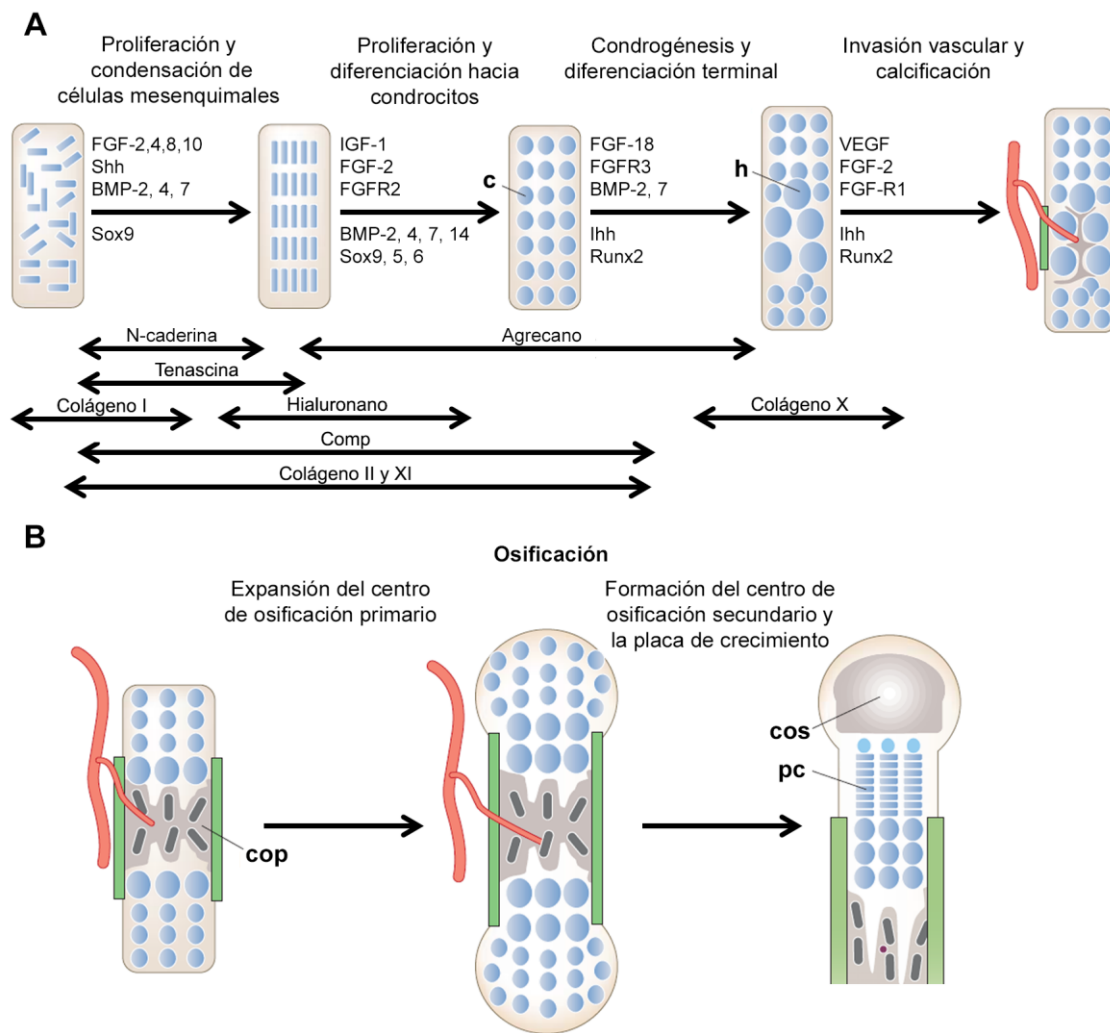


Figura 4. Esquema del proceso de osificación endocondral. (A) Esquema de los eventos sufridos durante la condrogénesis de la osificación endocondral, que muestra las diferentes etapas a lo largo del tiempo, incluyendo los patrones de expresión de diferentes factores de diferenciación y transcripción involucrados, junto con la expresión de las diferentes proteínas características de la MEC (abajo). (B) Esquema del proceso de osificación a partir del cartílago preexistente. El proceso de osificación se extenderá de forma longitudinal, en las epífisis se formarán los centros de osificación secundarios. En las metáfisis quedarán las placas de crecimiento, un remanente de tejido cartilaginoso. (c) condrocitos, (h) condrocitos hipertróficos, (cop) centro de osificación primario, (cos) centro de osificación secundario y (pc) placa de crecimiento. Imagen modificada de Kronenberg et al. 2003 y Goldring et al. 2006.

En la siguiente etapa, los condrocitos se diferencian hacia un fenotipo hipertrófico y se produce la calcificación de la matriz extracelular, la invasión vascular y la osificación. Los condrocitos localizados en el centro del molde de cartílago serán los primeros en entrar en hipertrofia, aumentando 20 veces su volumen y comenzando a expresar *Ihh*, que es requerido para la formación del hueso y se encarga de sincronizar la angiogénesis esquelética (St-Jaques et al. 1999). También se comienzan a expresar *Col10a1* y la fosfatasa alcalina. Además, los condrocitos hipertróficos sintetizarán MMP-13 (*Matrix Metalloprotease -13*), una diana de transcripción de Runx2, que, junto con MMP-9 (*Matrix Metalloprotease -9*) degradan la matriz de cartílago no mineralizada (Vu et al. 1998; Ortega et al. 2004). Por último, se produce una invasión del pericondrio y la zona hipertrófica por parte de vasos sanguíneos, mediada por VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Gerber et al. 1999) (Fig. 4A).

Las BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*) juegan un papel clave durante la condrogénesis, iniciando la diferenciación de las células condroprogenitoras, pero también regulando su maduración y posterior hipertrofia. BMP-2, -4 y -7 y sus antagonistas, como Noggin, regulan de forma coordinada el

patrón de formación de los elementos óseos de las extremidades (Pizette y Niswander 2000; Niswander et al. 2002; Tickle et al. 2003). BMP2 induce la diferenciación hacia condrocitos de células mesenquimales de hueso humanas (Cucchiaroni et al. 2011), células madre derivadas de tejido adiposo (An et al. 2010) y fibroblastos embrionarios de ratón (Pan et al. 2008), y promueve la condensación, diferenciación, proliferación e hipertrofia de los condrocitos; a partir de células mesenquimales (Yoon et al. 2004). *BMP-7* se expresa en los condrocitos proliferativos (Minima et al. 2002), mientras que *BMP-6* y *BMP-2* se expresan en los condrocitos hipertróficos exclusivamente (Itoh y Ornitz 2004).

4.1. Matriz Extracelular (MEC) de Cartílago.

La MEC de cartílago es el principal componente del tejido cartilaginoso. Es una estructura extracelular creada por los propios condrocitos, que les provee de soporte mecánico y bioquímico. Está compuesta por varios tipos de moléculas que forman redes multiproteicas: El colágeno es su principal componente y de ellos, *Col2a1* es el más abundante. Las moléculas de *Col2a1* se asocian formando homotrímeros que se disponen formando fibrillas (Kadler et al. 2008; Keene et al. 1995). Se observó que el ratón nulo para *Col2a1* presenta un tamaño menor con respecto al ratón silvestre, debido a una falta de desarrollo de los huesos largos y la placa de crecimiento (Li et al. 1995).

Otro tipo de colágeno presente en la MEC de cartílago, es el tipo XI, que participa en la formación de las fibrillas, regulando su diámetro. Se encuentra formando heterotrímeros, formados por cadenas de *Col11a1*, *Col11a2* y *Col2a1* (Keene et al. et al. 1995; Kadler et al. 2008). Por otro lado, el colágeno tipo IX, se une a la superficie de las fibrillas tipo II o XI y regula la interacción entre ellas mismas y con otras proteínas de la MEC. El colágeno tipo X (*Col10a1*) se expresa en la zona hipertrófica de la placa de crecimiento, interacciona con las fibrillas y las dispone en redes hexagonales (Schmid et al. 1985; 1990; Kwan et al. 1991).

Otros componentes importantes de la MEC de cartílago son: los proteoglicanos, las matrilinas y la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP). Los proteoglicanos están formados por proteínas unidas a glicosaminoglicanos. La MEC contiene tres glicosaminoglicanos principalmente: hialuronano, condroitín sulfato y queratán sulfato. Varias moléculas de condroitín y queratán sulfato se unen a Agc1 para formar proteoglucanos. Más de 300 proteoglucanos, se unen a su vez a un núcleo de hialuronano y dan lugar a grandes agregados proteicos. Las cadenas de condroitín sulfato generan gran densidad de cargas negativas que retienen moléculas de agua que da elasticidad al cartílago y le permite ser resistente al estrés mecánico y a la compresión (Myllyharju 2014).

Las matrilinas son cuatro proteínas multidominio (MATN1-4) capaces de interactuar entre sí con las fibrillas de colágeno y de unirse covalentemente al agregado, son consideradas proteínas adaptadoras del ensamblaje de la MEC (Klatt et al. 2011). Los ratones *knock-out* para las matrilinas 1, -2 y -3 no presentan grandes defectos en el desarrollo esquelético ni en la MEC de cartílago, lo que sugiere que juegan un papel redundante (Aszódi et al. 1999; Ko et al. 2004; Mates et al. 2004). Sin embargo, a pesar de la formación normal del esqueleto y la correcta disposición de la placa de crecimiento, se observó que el ratón *knock-out* de *Matn1* muestra defectos en la formación de las fibrillas de colágeno (Huang et al. 1999) y el ratón *knock-out* de *Matn3* presenta maduración prematura y elongación de la zona hipertrófica (van der Weyden et al. 2006).

COMP es una proteína pentamérica que es capaz de interactuar con varias proteínas de la MEC de cartílago, incluyendo los colágenos tipo I, II y IX y las matrinas (Posey et al. 2014). Se ha visto que defectos en COMP causan su retención en el retículo endoplasmático (RE) debido a problemas de plegamiento, lo que provoca la muerte celular y la reducción del número de condrocitos de la placa de crecimiento (Hetch et al. 1998). Además, los defectos en *Comp* provocan una reducción simultánea de la secreción de las proteínas de la MEC con las que interactúa, como matrilina-3 y colágeno tipo IX, que quedan retenidas en el RE (Posey et al. 2009).

La MEC de cartílago juega un papel fundamental en la regulación celular, ya que sirve como almacén para varios factores de crecimiento. Cambios en las condiciones fisiológicas pueden activar a proteasas que degraden la matriz, y dar lugar a una liberación de estos factores de forma local y rápida, que estimularán a los condrocitos. La MEC sufre un proceso de remodelación constante, ya que se da al mismo tiempo, una producción constante de sus componentes junto con una degradación por parte de metaloproteasas de la matriz (MMPs) (Gao et al. 2014).

Los genes que codifican las proteínas características de la MEC de cartílago se han asociado con un gran número de displasias esqueléticas (Tabla 1, Anexo I).

5. Placa de crecimiento.

La placa de crecimiento se encuentra en las metáfisis de los huesos largos y está formada por un remanente de cartílago hialino. Contiene numerosos condrocitos, que van a sufrir una serie de procesos de división rápida para después madurar y entrar en hipertrofia y, por último, en apoptosis. Este proceso permite el crecimiento longitudinal de los huesos largos y por tanto del individuo. Al final de la pubertad, se produce un descenso en la tasa de división de los condrocitos y la placa de crecimiento es remplazada completamente por el hueso.

5.1. Zonas de la placa de crecimiento.

En la placa de crecimiento podemos distinguir cuatro zonas bien definidas (Fig. 5), que desde las epífisis a la diáfisis se disponen en el siguiente orden:

La **zona de reserva** es la zona más próxima a las epífisis, en ella los condrocitos se encuentran en estado latente, con una baja tasa de proliferación. Estos presentan una morfología pequeña, uniforme y compacta y aparecen casi siempre en solitario, rodeados por el surco de Ranvier (Melrose et al. 2008). Esta zona se caracteriza por la síntesis de Col2a1 y proteoglicanos como Agc1 (Ballock et al. 2003) (Fig. 5).

La **zona proliferativa** conecta directamente con la zona de reserva, en ella los condrocitos se dividen de forma acelerada, presentan una morfología plana y se disponen en columnas. En esta zona se da un incremento en la síntesis de Col2a1 y Col11a1 (Ballock et al. 2003) (Fig. 5).

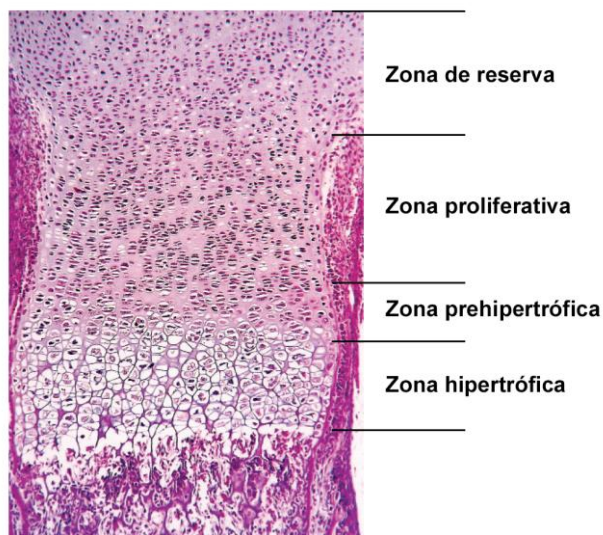


Figura 5. Estructura de la placa de crecimiento. Corte longitudinal de la epfisis femoral de un rat6n de 21 d6as, te6ido con hematoxilina-eosina. Se pueden apreciar las diferentes zonas de la placa de crecimiento: reserva, proliferativa, prehipertr6fica e hipertr6fica (Burdan et al. 2009).

La siguiente es la **zona prehipertr6fica** donde los condrocitos pierden su capacidad de divisi6n y comienzan a sintetizar gran cantidad de prote6nas de la MEC, como son col6genos de cadena corta, como Col10a1, y fosfatasa alcalina, que incrementa la cantidad de iones fosfato necesarios para la calcificaci6n (Ballock et al. 2003; Provot et al. 2008; Melrose et al. 2008). Los condrocitos aumentan su volumen celular unas diez veces, dando lugar a la **zona hipertr6fica**, donde se completa la mineralizaci6n de cart6lago. Finalmente los condrocitos secretan VEGF que induce la formaci6n de vasos sangu6neos y mueren por apoptosis (Fig. 5).

5.2. Regulaci6n de la placa de crecimiento.

En la placa de crecimiento se dan una serie de cambios complejos que promueven la correcta proliferaci6n e hipertrofia de los condrocitos. Este proceso se encuentra altamente regulado por varios factores, incluyendo factores de transcripci6n y factores solubles. Los mecanismos regulatorios de la placa de crecimiento se han dividido en cuatro grupos que se encuentran altamente relacionados entre s6: regulaci6n endocrina, paracrina, epigen6tica y a trav6s de factores de transcripci6n.

5.2.1. Regulaci6n endocrina.

La regulaci6n de la placa de crecimiento est6 influenciada por varios mecanismos endocrinos, muchos de los cuales act6an directamente sobre ella, estos quedan resumidos en la Tabla 2 (Anexo I):

5.2.1.1. GH (Hormona de crecimiento) e IGF-I (Factor de crecimiento insul6nico tipo I).

El eje GH/IGF-I es un sistema complejo que regula gran cantidad de procesos, entre ellos el crecimiento. La GH se secreta en la pituitaria, y su expresi6n se encuentra regulada por dos hormonas hipotal6micas: la somatocrinina o GHRH (hormona liberadora de la hormona de crecimiento) que activa su secreci6n, y la SST (somatostatina), que la inhibe. La GH viaja por el torrente sangu6neo hacia sus tejidos diana, donde se unir6 a su receptor (GHR) (Fig. 6). Una de sus misiones es estimular la expresi6n de IGF-I, IGFBP-3 (Prote6na de uni6n a IGF-I) e IGFBP3 (Unidad 6cido-l6bil de IGF-I) en el h6gado, que se unir6n para formar un complejo ternario, donde IGFBP3 e IGFBP3 protegen a IGF-I de ser degradada durante su transporte a trav6s de los vasos sangu6neos. IGF-I viajar6 hasta el hueso, donde interactuar6 con IGF-IR (Receptor de IGF-I), su receptor, y estimular6 el crecimiento (Daughaday et al. 2000; Yakar

et al. 2002). Ratones *knock-out* condicionales, que no sintetizan IGF-I en el hígado, ven reducidos sus niveles circulantes de IGF-I en un 75%, pero no presentan deficiencias en el crecimiento postnatal (Yakar et al, 1999). No obstante, la deficiencia combinada del IGF-I liberado por el hígado e IGFALS produce una reducción de hasta un 90% en los niveles circulantes de IGF-I, acompañada de una disminución del crecimiento lineal y del tamaño de la placa de crecimiento (Yakar et al, 2002) (Fig. 6).

Se cree que el efecto de GH a través de IGF-I se puede dar también de forma local, ya que ratones *knock-out* condicional que no expresan IGF-I en condrocitos presentan reducción del crecimiento (Govoni et al. 2007). Otra hipótesis se basa en que la GH puede también actuar de forma directa sobre la placa de crecimiento, activando la proliferación de los condrocitos de la zona de reserva de modo independiente de IGF-I (Ohlsson et al, 1992).

5.2.1.2. GCs (Glucocorticoides).

Los GCs tienen un efecto directo en el crecimiento, ya que un exceso de glucocorticoides provoca la supresión del crecimiento en niños (Allen et al. 1994). Los receptores de glucocorticoides se expresan en todos los condrocitos de la placa de crecimiento, pero en mayor medida en los condrocitos hipertróficos (Abu et al. 2000). Se observó que el tratamiento con corticosterona produce una reducción del ancho de la placa de crecimiento, debido a la inhibición de la proliferación y al aumento de la hipertrofia de los condrocitos (Silvestrini et al 2000; Gafni et al. 2001; Kemer et al. 2015).

5.2.1.3. Hormonas Tiroideas.

Se sabe que la administración de la hormona tiroidea (TH) en ratas jóvenes provoca una aceleración de la osificación endocondral del esqueleto (Walker 1957). En cuanto a la placa de crecimiento, se observó que la deficiencia de TH provoca su desorganización y defectos en la diferenciación de los condrocitos hacia células hipertróficas (Van Vliet et al. 2003). Este efecto se puede llevar a cabo mediante una acción directa, puesto que los receptores de hormonas tiroideas se expresan en los condrocitos de la zona hipertrófica y de reserva (Robson et al. 2000), o de forma indirecta, ya que se ha demostrado que las hormonas tiroideas participan en la regulación de otros mecanismos regulatorios, como por ejemplo, IGF-I (Xing et al. 2012) o PTHrP (Dentice et al. 2005).

5.2.1.4. Estrógenos.

Los estrógenos son los encargados de la maduración esquelética y cierre epifisario (Smith et al. 1994; Chagin y Savendahl, 2007). Llevan a cabo su regulación a través de dos vías: de forma directa a través de su receptor (ER- α), que se expresa en los condrocitos de la placa de crecimiento (Nilsson y Koehler, 2005), y de forma indirecta, estimulando la síntesis de GH (Grumbach et al, 2000). En adultos, los estrógenos regulan el mantenimiento del hueso, gracias a sus efectos antireabsortivo y anabólico. En mujeres, estas hormonas reducen la actividad de reabsorción de los osteoclastos, gracias a que estos expresan receptores de andrógenos (ER- α). En hombres, sin embargo, el efecto de los estrógenos sobre el hueso se da en los osteoblastos, ya que son ellos los que expresan ER- α (Frenkel et al. 2010).

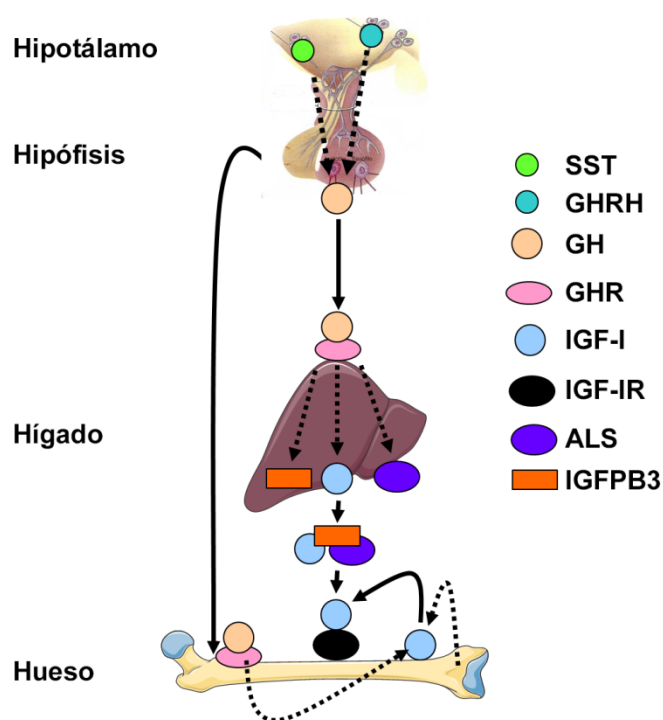


Figura 6. Esquema del efecto del eje GH/IGF-I sobre el hueso. La GH influye sobre la placa de crecimiento a varios niveles: de una forma directa sobre los condrocitos; a través de la expresión de IGF-I, ALS e IGFBP3 en el hígado; o de IGF-I en la propia placa de crecimiento.

5.2.1.5. Andrógenos.

Los andrógenos son hormonas masculinas producidas por los testículos, que se dan en muy bajas concentraciones en mujeres, los más importantes son la testosterona y la androsterona. Presentan funciones similares a los estrógenos: incrementan la actividad de los osteoblastos, producen un descenso de la formación de los osteoclastos y de su actividad, que conlleva una inhibición de la eliminación del calcio, y estimulan el crecimiento de los huesos largos durante la pubertad (Maor et al., 1999; Krohn et al., 2003). Cuando la secreción de los andrógenos se reduce, la actividad de los osteoclastos aumenta respecto a la actividad de los osteoblastos, provocando una reducción de la formación de hueso (Tivesten et al 2004; Karperien et al. 2005).

El papel de los andrógenos en el crecimiento no está claro. Existen argumentos a favor del efecto directo de los andrógenos sobre la placa de crecimiento: la presencia de receptores de andrógenos en la placa de crecimiento, que la placa de crecimiento se ensancha al inyectarle testosterona y que los niños tratados con andrógenos no aromatizables muestran aceleración del crecimiento (van der Eerden et al. 2006). Por otro lado, se cree que el efecto de los andrógenos en la placa de crecimiento se da debido a su conversión en estrógenos gracias a una aromatasa local (Oz et al. 2001), ya que hombres con deficiencia de dicha aromatasa presentan retraso del desarrollo óseo y osteopenia (Morishima et al 1995).

5.2.2. Regulación paracrina.

La organización estratificada de la placa de crecimiento requiere una serie de mecanismos locales que controlen de una forma muy precisa el comportamiento de las células durante la condrogénesis. Las señales más importantes son:

5.2.2.1. FGFs (Factores de crecimiento de fibroblastos).

Los FGFs juegan un papel fundamental en la condrogénesis, se sabe que defectos en los FGFs y sus receptores (FGFRs) son los responsables de un grupo diverso de patologías esqueléticas (Xie et al. 2014). Una de las más relevantes es la acondroplasia (MIM: 100800), la forma más común de enanismo, que está causada por una mutación de ganancia de función en el gen *Fgfr3* (Ornitz y Marie 2002; Wilkie et al. 2002). La expresión de *Fgfr3* se inicia durante la condensación de los condrocitos y se mantiene hasta que los condrocitos salen de la zona proliferativa de la placa de crecimiento (Peters et al. 1993). Modelos animales de acondroplasia (ganancia de función de *Fgfr3*, *Fgfr3^{ACH}*) y de pérdida de función de *Fgfr3* (*Fgfr3^{-/-}*) demostraron que FGFR3 disminuye la proliferación y promueve la diferenciación de los condrocitos (Colvin et al. 1996; Deng et al. 1996; Ornitz y Marie 2002). Se cree que FGFR3 lleva a cabo su papel regulatorio a través de la vía de STAT (*Signal transducer and activator of transcription*) y de las MAPKs (*Mitogen-Activated protein Kinases*) (Murakami et al. 2004).

Los mecanismos reguladores de la placa de crecimiento se encuentran altamente relacionados entre sí. Por ejemplo, FGFR3 reprime la expresión de *Ihh*/PTHrP y *Bmp4* (Naski et al. 1998; Chen et al. 2001).

5.2.2.2. BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*).

Las BMPs pertenecen a la superfamilia TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) que es un extenso grupo de factores de transcripción solubles (Massague 1998). Se cree que las BMPs forman un gradiente a lo largo de la placa de crecimiento, siendo sintetizadas por los condrocitos de la zona hipertrófica y difundiendo hacia la zona de reserva (Nilsson et al. 2007). Este sistema podría regular la diferenciación progresiva de los condrocitos a lo largo de la placa de crecimiento (De Luca et al. 2001), de hecho la falta de *Bmp2* causa defectos severos en la proliferación y diferenciación de los condrocitos (Shu et al. 2011). Por otro lado, *BMP6* también es sintetizado por los condrocitos hipertróficos, se sabe que ratones con haploinsuficiencia de *Bmp2* y ausencia total de *Bmp6* presentan placas de crecimiento más pequeñas y menor formación de hueso (Kugimiya et al. 2005). Se ha demostrado que la vía de señalización Wnt modula también la actividad de *BMP2* (Nakashima et al. 2005; Zhang et al. 2013).

Se observó que los ratones *knock-out* para *Noggin* (*Nog*), el antagonista de las BMPs, muestran sobrecrecimiento de las zonas cartilaginosas (Nifuji et al. 1999; 2004), confirmando así el papel de las BMPs en la placa de crecimiento.

5.2.2.3. *Ihh* (*Indian Hedgehog*) y PTHrP (*Parathyroid Hormone-related Protein*).

Ihh y PTHrP crean un bucle de retroalimentación que regula el paso de los condrocitos a través de las distintas zonas de la placa de crecimiento. PTHrP es producido por los condrocitos periauriculares (Kronenberg et al. 2006) y estimula la proliferación de los condrocitos en la zona proliferativa de la placa de crecimiento, lo que provoca que estos se dividan y se separen del foco de PTHrP escapando a su regulación. Esto hace que los condrocitos dejen de dividirse y pasen a convertirse en condrocitos prehipertróficos y secreten *Ihh*, que difunde hacia la zona de reserva donde estimula la síntesis de PTHrP y además promueve la osificación del pericondrio (Minina et al. 2001, 2002; Kobayashi et al. 2002; Kronenberg et al. 2003). Varios estudios han demostrado que *Ihh* también es capaz de estimular la

proliferación y maduración de los condrocitos a través de una vía independiente de PTHrP y se cree que las rutas de Wnt y BMP pueden estar involucradas (Kobayashi et al. 2005; Mak et al. 2008).

5.2.2.4. Rutas de señalización de Wnt (*Wingless-type*).

Las rutas Wnt juegan múltiples papeles en la condrogénesis, algunos de ellos inhibidores. La familia Wnt está formada por 19 miembros que traducen su señal a través de diferentes rutas. Entre todas, la más estudiada ha sido la vía canónica, en la que las rutas Wnt estabilizan a la β -catenina, que transloca al núcleo y regula la expresión de determinados genes (Logan y Nusse 2004), que inhiben la condrogénesis (Akiyama et al. 2004). Estos efectos están provocados, al menos en parte, por el papel antagonista de Sox9 y β -catenina, se sabe la sobreexpresión de Sox9 y la inactivación de β -catenina producen fenotipos similares y que β -catenina y Sox9 se expresan de forma opuesta en la placa de crecimiento e interaccionan (Akiyama et al. 2004; Day et al. 2005; Hill et al. 2005).

5.2.2.5. CNP/NPR-B/GMPc (péptido natriurético tipo C / receptor del péptido natriurético-B / Guanosin monofosfato cíclico).

CNP actúa como molécula de señalización uniéndose a su receptor, NPR-B (receptor del péptido natriurético B) (Koller et al. 1991; Suga et al. 1992). Como consecuencia de esta unión NPR-B se activa y comienza a sintetizar GMPc intracelular, que activa enzimas sensibles a GMPc, como son las proteínas quinasas I y II (PRKG1 y PRKG2), desencadenando así una respuesta intracelular (Pilz et al. 2003). Se observó que PRKG2 regula la actividad de FGFR3 mediante la ruta de señalización de las MAPK, a través la inhibición de RAF-1 (*Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*), el activador de MEK1/2 (*Mitogen-Activated protein Kinase Kinase 1, -2*) (Geister et al. 2013). El mecanismo por el que se produce dicha inhibición no se conoce bien, pero se cree que está relacionado con la activación de p38 (*p38 MAP Kinase*) (Agoston et al. 2007; Hutchison 2012). Por otro lado, la activación de MEK1/2 también inhibe la síntesis de GMPc por parte de NPR-B (Chrisman y Gabers 1999; Ozasa et al. 2005).

La ruta CNP/NPR-B/GMPc juega un papel clave en la regulación de la placa de crecimiento. Tanto *Nppc* como *Npr2*, los genes que codifican el ligando Cnp y su receptor, Npr-b, se expresan en los condrocitos proliferativos y prehipertróficos de la placa de crecimiento (Chusho et al. 2001). Ratones con ausencia de Cnp presentan un enanismo severo y placas de crecimiento muy similares a las de pacientes con acondroplasia (Chuso et al. 2001). Ratones con mutaciones en Npr-b tienen enanismo desproporcionado y acortamiento de las extremidades (Tsuji y Kunieda 2005). Ambos ratones presentan estrechamiento de la placa de crecimiento y reducción del número de condrocitos hipertróficos (del Marco 1981). CNP y NPR-B serán ampliamente estudiados en esta tesis, por lo tanto, serán descritos a continuación:

5.2.2.5.1. Péptido natriurético tipo C (CNP).

CNP forma parte de la familia de los péptidos natriuréticos, junto con ANP (péptido natriurético atrial) y BNP (péptido natriurético tipo B). Al contrario que los otros dos miembros, CNP no es capaz de estimular la natriuresis. En lugar de ello, CNP está presente en altas cantidades en el cartílago donde actúa como un regulador local (Hagiwara et al. 1994). También se encuentra altamente expresado en cerebro (Minamino et al. 1991).

NPPC (precursor del péptido natriurético tipo C) (NM_024409) es el gen que codifica CNP, que en humanos se encuentra en el cromosoma 2q37.1. *NPPC* está formado por tres exones de los cuales solo dos son codificantes. CNP es traducido como un propéptido de 103 residuos, y una endoproteasa intracelular, la furina, lo degrada a la forma de 53 residuos (CNP-53) (Wu et al. 2003). En algunos tejidos, CNP-53 es digerido a CNP-22 por una enzima desconocida. CNP-53 y CNP-22 muestran funciones idénticas (Yeung et al. 1996).

El ratón *knock-out* de *Cnp* (*Nppc*^{-/-}) muestra enanismo desproporcionado, con miembros cortos debido a defectos en la osificación endocondral, y muerte postnatal. En cuanto a la placa de crecimiento, presenta una reducción de las zonas proliferativa e hipertrófica respecto al ratón *Nppc*^{+/+} (silvestre) (Chusho et al. 2001). Sin embargo, los ratones transgénicos con sobreexpresión de *Nppc* (col2-CNP-Tg y SAP-*Nppc*-Tg) muestran sobrecrecimiento y expansión de las zonas proliferativa e hipertrófica e la placa de crecimiento (Yasoda et al. 2004; Kake et al. 2009). Se observó que al expresar *Nppc* de nuevo mediante expresión transgénica, tanto de forma local, como endocrina (desde el hígado) se producía un rescate del fenotipo de los ratones *Nppc*^{-/-} (Chusho et al. 2001; Fujii et al. 2010).

Estudios de asociación del genoma completo (*Genome-wide association study*, GWAS) concluyeron que *NPPC* está relacionado con la variabilidad en la estatura en humanos (Gudbjartsson et al. 2008; Estrada et al. 2009; Soranzo et al. 2009; Lanktree et al. 2011). Además, se ha descrito una translocación balanceada que causa la sobreexpresión de *NPPC*, en un paciente con talla alta, manos y pies largos, con un hallux muy largo, y otras anomalías esqueléticas (Bocciardi et al. 2007). Por otro lado, se cree que la haploinsuficiencia de CNP es la causa de la talla baja presente en un paciente con una delección de 1,9 Mb en el cromosoma 2q37, que incluye 20 genes, entre ellos *NPPC* (Tassano et al. 2013). Por lo tanto, defectos en heterocigosis de este gen podrían ser la causa de fenotipos relacionados con la estatura, como por ejemplo TBI (talla baja idiopática) o talla baja desproporcionada.

5.2.2.5.2. NPR-B (Receptor del péptido natriurético tipo B).

NPR-B pertenece a la familia de receptores de péptidos natriuréticos, compuesta además por NPR-A y NPR-C (receptor de péptido natriurético tipo A y C, respectivamente). NPR-B está altamente relacionado con el crecimiento del hueso endocondral (Bartels et al. 2004). A parte de los condrocitos, NPR-B se encuentra presente en varios tejidos, como cerebro, pulmón, útero y piel (Wilcox et al. 1991; Chusho et al. 2001; Potter et al. 2006). NPR-B es codificado por el gen *NPR2*, localizado en el cromosoma 9p12-p21 y está compuesto por 22 exones.

La proteína NPR-B presenta una estructura modular: 1) Tiene un dominio extracelular que le permite unirse a los tres péptidos natriuréticos, pero con diferente eficiencia, siendo más eficiente su unión a CNP (CNP >> ANP ≥ BNP) (Koller et al. 1991; Suga et al. 1992); 2) un dominio transmembrana; 3) un dominio intracelular de homología a quinasa, y 4) un dominio carboxi-terminal guanilato ciclasa que, como respuesta al estímulo de CNP, sintetizará GMPC a partir de guanosina trifosfato (GTP) (Potter et al. 2006).

El papel de NPR-B en cartílago fue confirmado en ratón. Se descubrió que mutaciones en homocigosis de *Npr2*, eran la causa del fenotipo presentado por varias cepas de ratón, *Npr2*^{cn/cn} (Tsuiji et al. 2005) y *Npr2*^{slw/sl} (*short-limb dwarfism*) (Sogawa et al. 2007). Ambos presentan placas de crecimiento

reducidas, con bajo número de condrocitos proliferativos e hipertróficos (Tsuji et al. 2005; Sogawa et al. 2007). Se ha descrito que tanto el ratón *knock-out* de *Npr2* (*Npr2*^{-/-}), como el ratón *pwe* (*peewee*), portador de otra mutación espontánea en homocigosis en *Npr2* (*Npr2*^{pwe/pwe}), presentan, además de los problemas óseos, infertilidad en las hembras provocada por atrofia del útero (Geister et al. 2013; Tamura et al. 2004).

NPR2 está asociado a varias patologías en humanos. Defectos en homocigosis o heterocigosis compuesta de *NPR2* causan la displasia acromesomélica, tipo Maroteaux (AMDM, MIM 602875) (Bartels et al. 2004), una enfermedad rara, con una prevalencia de <1/1.000.000 nacimientos. La AMDM se caracteriza por causar un fenotipo similar a la DML, con talla baja extrema (<5 DE), acortamiento de las extremidades, curvatura de antebrazo y acortamiento de los metacarpos y las falanges (Maroteaux et al. 1971; Bartels et al. 2004). La mayoría de las mutaciones encontradas en pacientes con AMDM provocan la retención de NPR-B en el RE, promoviendo así una reducción de su actividad debido a problemas en el transporte celular (Hume et al. 2009). Curiosamente, los familiares de pacientes con AMDM que portaban las mutaciones de *NPR2* en heterocigosis son más bajos que la media para su población (Borrelli et al. 1983; Bartels et al. 2004; Olney et al. 2006). Sin embargo, no muestran diferencias de proporción en las extremidades (Olney et al. 2006). Recientemente, varios estudios han encontrado mutaciones en heterocigosis de *NPR2* en 2-6% de pacientes con talla baja (Vasques et al. 2013; Amano et al. 2014; Wang et al. 2014). También se han caracterizado mutaciones de ganancia de función de *NPR2* que dan lugar al fenotipo opuesto, talla alta, escoliosis, aracnodactilia y hallux largo (Miura et al. 2012; 2014; Hannema et al. 2013), fenotipo idéntico al obtenido al sobreexpresar *NPPC* (Bocciardi et al. 2007).

5.2.3. Regulación epigenética y micro ARNs.

Cada vez hay más evidencias de que la placa de crecimiento sufre una gran regulación epigenética y a través de micro ARNs (Goldring et al. 2012), que son pequeños ARN monocatenarios que regulan la expresión de otros genes a un nivel postranscripcional.

La modificación de histonas, involucrando acetilaciones y deacetilaciones causa cambios en el fenotipo de los condrocitos. Por ejemplo, se ha sugerido que la HDAC4 (Histona deacetilasa- 4) previene la hipertrofia prematura de los condrocitos a través del bloqueo de la actividad de Runx2 (Vega et al. 2004). Estudios *in vitro* demostraron que la inducción de *COL10A1* durante la condrogénesis estaba relacionada con la demetilación de dos sitios CpG (la metilación de estos sitios se ha asociado con represión génica) en el promotor de *COL10A1* (Zimmermann et al. 2008).

Se han identificado varios microARNs que regulan el correcto desarrollo de los condrocitos. El microARN, miR-145 actúa directamente inactivando los transcritos de *Sox9*, regulando así la diferenciación condrogénica de las células mesenquimales (Yang et al. 2011). Por otro lado, ratones con miR-140 defectivo presentan alteraciones esqueléticas leves, como talla baja y osteoartritis relacionada con la edad (Miyaki et al. 2010).

5.2.3. Factores de transcripción.

5.2.3.1. Trío SOX.

El trío SOX está formado por las proteínas Sox9, L-Sox5 (la isoforma larga de Sox5) y Sox6, que interaccionan entre sí para formar un complejo fundamental en la condrogénesis. Sox9 dirige el paso de células mesenquimales a condrocitos (Akiyama 2011) y, junto con Sox5 y Sox6, controla su correcta diferenciación (Akiyama et al. 2002; Smits et al. 2001, 2004; Han et al. 2008).

5.2.3.1.1. SOX9.

Es un miembro de la familia de factores de transcripción Sox, caracterizados por un dominio de unión al ADN de tipo HMG (High Mobility Group), cuya secuencia es igual en al menos un 50% con respecto a la de SRY (de Crombrughe et al. 2000). Sox9 tiene un dominio de activación y un dominio capaz de reconocer sitios de unión al ADN de tipo HMG, ya sean dobles o simples (Lefebvre et al. 1997).

Sox9 es sintetizado por todas las células condroprogenitoras y por los condrocitos, salvo los condrocitos hipertróficos (Ng et al. 1997; Wright et al. 1997; Zhao et al. 1997), donde controla la expresión de los genes que codifican las proteínas que forman parte de la MEC de cartílago, como colágeno tipo II, IX y XI y agregano entre otros (de Crombrughe et al. 2000).

El papel de SOX9 en condrogénesis fue demostrado por primera vez gracias a que se descubrió que defectos en heterocigosis de *SOX9* causan la displasia campomélica (MIM: 114290), que se caracteriza por hipoplasia de todos los elementos esqueléticos endocondrales y disgenesia gonadal (Foster et al. 1994; Wagner et al. 1994). Ratones heterocigotos *Sox9*^{+/-} presentan un fenotipo similar a la displasia campomélica, son más pequeños, presentan hipoplasia de los huesos endocondrales, elongación de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento y mineralización prematura de las estructuras óseas (Bi et al. 2001). Se creó un ratón *knock-out* condicional *Sox9*^{-/-}, en el que *Sox9* estaba ausente únicamente en las extremidades (el ratón homocigoto *Sox9*^{-/-} presenta alta letalidad). Este ratón mostró una ausencia total de elementos óseos y de la condensación mesenquimal previa a la condrogénesis y una disminución de la expresión de varios marcadores de los condrocitos, como *Runx2*, *Ihh* y *Pthrp* (Akiyama et al. 2002). Estos datos demuestran que Sox9 es esencial para que se den varios pasos en la formación de los huesos y la condrogénesis.

5.2.3.1.2. SOX5 y SOX6.

L-Sox5 y Sox6 pertenecen también a la familia de factores de transcripción HMG, presentan una alta homología entre sí, pero no con Sox9, ya que solo comparten el dominio HMG. Ambos son capaces de homo- y heterodimerizar entre sí. Carecen de dominio de activación, por lo que será necesaria su unión a Sox9 y formar el trío Sox, para así regular la expresión de *Col2a1* y *Agc1* entre otros (Lefebvre et al. 2001; Han et al. 2008). *Sox5* y *Sox6* se expresan en las mismas zonas que *Sox9* (Lefebvre et al. 1998).

Sox5 y Sox6 tienen un papel redundante en la condrogénesis, ya que ratones mutantes para *Sox5* (*Sox5*^{-/-}) o *Sox6* (*Sox6*^{-/-}) presentan anormalidades esqueléticas muy leves, mientras que el doble mutante (*Sox5*^{-/-}; *Sox6*^{-/-}) muere en el útero y presenta ausencia de cartílago (Smits et al. 2001). En estos ratones, se da la condensación mesenquimal, pero hay ausencia de diferenciación de condrocitos, a pesar de presentar niveles de expresión de *Sox9* normales (Smits et al. 2001). Se sabe que la expresión de *Sox5* y

Sox6 depende totalmente de *Sox9*, ya que la inactivación de *Sox9* provoca una ausencia total de ambos (Akiyama et al. 2002).

5.2.3.1.3. Dianas del trío SOX.

El trío SOX es capaz de reconocer más de mil dianas en el genoma, uniéndose preferentemente a regiones enhancers (Liu y Lefebvre 2015). Se ha demostrado que el trío SOX regula la expresión de varios genes esenciales en la formación y regulación del cartílago, entre ellos destacan varias proteínas características de la MEC, como son *Comp* (Liu et al. 2007), *Agc1* (Han et al 2008), *Col2a1* (Lefebvre et al. 1998) y *Matn1* (Rentsendorj et al, 2005). También regula la expresión de *miR-140* (Yamashita et al. 2012), un micro ARN muy relacionado con la formación del cartílago (Tuddenham et al. 2006; Miyaki et al. 2010) y de *S100A1* y *S100B*, que codifican proteínas de la familia S100 que actúan como reguladores de otras proteínas. Ambas están expresadas en los condrocitos proliferativos, prehipertróficos e hipertróficos de la placa de crecimiento, y se sabe que suprimen su diferenciación hipertrófica *in vitro* (Saito et al. 2007). El ratón doble *knock-out* de ambos (*S100a1*^{-/-}; *S100b*^{-/-}) no presenta defectos esqueléticos, por lo que se cree que su función puede estar enmascarada por otras proteínas de la familia S100 (Mori et al. 2014).

5.2.3.2. SHOX y SHOX2 (*Short stature homeobox containing gene 2*).

Son factores de transcripción pertenecientes a la familia homeodominio y regulan la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento. Como ambos juegan un papel importante en la presente Tesis Doctoral, se les dedicará una mayor atención en los siguientes apartados.

6. SHOX (*Short stature Homeobox*).

SHOX es un factor de transcripción que pertenece a la familia de los *homeobox* tipo *paired* (Rao et al. 2001), concretamente a la subclase Q50 debido a que contiene una glutamina en la posición 50 del homeodominio. Esta subclase reconoce preferentemente las secuencias palindrómicas de ADN P3: 5'-TAATNNNATTA-3', con tres nucleótidos en el centro del palíndromo (Rao et al. 2001). SHOX también puede unirse a elementos P4, P5 y P6, a secuencias palindrómicas imperfectas (Marchini et al. 2007), e incluso a secuencias ricas en adeninas y timinas (Decker et al. 2011).

Se ha descrito la presencia de SHOX en varios tejidos: corazón, músculo esquelético, placenta, páncreas, hígado y células osteogénicas (Ellison et al. 1997; Rao et al. 1997). Durante el desarrollo embrionario, SHOX se localiza en las extremidades en desarrollo, perfilando el pre-cartílago endocondral, que dará lugar a los huesos (Clement-Jones et al. 2000). Dentro de la placa de crecimiento, *SHOX* se expresa en todos los tipos de condrocitos, desde la semana 12 de gestación hasta que esta se fusiona tras finalizar la etapa puberal (Munns et al. 2004; Marchini et al. 2004), donde detiene la proliferación de los condrocitos e induce su apoptosis (Marchini et al. 2004). Cabe destacar que SHOX no presenta ortólogo en varias especies, entre ellas los roedores (Clement-Jones et al. 2000).

La estructura proteica de SHOX consta de dos dominios: un homeodominio y un dominio OAR (Otp, Aristaless, Rax). El homeodominio contiene el motivo *homeobox* y permite a SHOX unirse al ADN (Decker et al. 2011; Marchini et al. 2007), interaccionar con otras proteínas (Aza-Carmona et al, 2011) y

translocarse al núcleo (Sabherwal et al. 2004a). El dominio OAR es necesario para la transactivación y permite a SHOX regular la actividad transcripcional de sus dianas (Simeone et al, 1994; Rao et al, 1997; Ellison et al, 1997).

SHOX está codificado por el gen *SHOX* (*Short stature homeobox containing gene*), localizado en la región pseudoautosómica 1 (PAR1) de los cromosomas sexuales. Esta región se comporta de forma autosómica, ya que escapa a la inactivación del cromosoma X (Rao et al. 1997, Ellison et al. 1997). *SHOX* da lugar a dos isoformas. SHOXa y SHOXb. La segunda carece de dominio de transactivación OAR, por lo tanto se considera inactiva en cuanto a su actividad transcripcional (Rao et al. 2001).

6.1. Patologías asociadas a SHOX.

Defectos en *SHOX* o sus regiones reguladoras se han asociado con dos displasias esqueléticas, la discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) y la displasia mesomélica de Langer (DML), así como con un porcentaje variable de pacientes con talla baja idiopática (TBI). Además, se observó que la talla baja presente en pacientes con síndrome de Turner (monosomía del cromosoma X, MIM 309585) está causada por la haploinsuficiencia de *SHOX* (Rao et al. 1997; Ellison et al. 1997). Las patologías asociadas a *SHOX* muestran un fenotipo similar al mostrado por los defectos en *NPR2*.

6.1.1. Discondrosteosis de Léri-Weill (DLW).

La DLW (MIM 127300) es una displasia esquelética caracterizada por una talla baja desproporcionada, debido a un acortamiento del segmento medio de las extremidades y por la deformidad de Madelung, que consiste en el acortamiento y curvatura del radio, dislocación distal del cúbito y configuración piramidal de los huesos del carpo (Léri y Weill. 1929) (Fig. 7). Otras características secundarias son: índice de masa corporal elevado, relación envergadura-talla inferior a 0,965, relación talla sentado-talla superior al 0,555, cúbito valgo, antebrazo corto, curvatura del antebrazo, hipertrofia muscular y dislocación del cúbito en el codo (Rappold et al, 2007).

La penetrancia de los defectos en heterocigosis de *SHOX* es alta, pero su expresión clínica es muy variable, algunos pacientes presentan una talla dentro del rango normal, mientras que otros no presentan la deformidad de Madelung, ni acortamiento mesomélico (Shears et al. 1998 y Ross et al. 2001). Incluso se han visto casos de familiares con la misma alteración molecular, que presentan un fenotipo diferente (Grigelioniene et al. 2001). Además, las características clínicas se vuelven más severas con la edad y suelen ser más graves en mujeres. El análisis auxológico de las proporciones corporales, la presencia de anomalías poco comunes y los rasgos radiológicos leves, pueden ser difíciles de detectar, por lo tanto, el análisis genético es imprescindible para la confirmación de la patología.



Figura 7. Características fenotípicas de un paciente con DLW. (A) Fotografía del antebrazo de un paciente con DLW donde se puede apreciar la prominencia distal del cúbito. (B) Radiografía de su antebrazo, se observa el acortamiento y curvatura del radio y la subluxación dorsal del cúbito. Imágenes extraídas de Seki et al. 2014.

El tratamiento con hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) está indicado para pacientes con DLW con haploinsuficiencia de *SHOX*, es decir con la falta de uno de sus alelos. En la mayoría de los pacientes, el tratamiento mejora la talla del individuo incrementándola unos 10-15 cm (+1,3 DE) si el tratamiento empieza desde la niñez (Blum et al. 2007). Por otra parte, 57% de los pacientes con defectos en *SHOX*, que han sido tratados con rhGH, alcanzaron una talla adulta por encima de -2 DE (Blum et al. 2013).

Aproximadamente un 70% de los pacientes diagnosticados con DLW presentan alteraciones en *SHOX* o sus regiones reguladoras (Chen et al. 2009; Benito-Sanz et al. 2006; Huber et al. 2006), entre las que se encuentran mutaciones puntuales, deleciones y duplicaciones parciales o completas del gen (Shears et al. 1998; Belin et al. 1998; Rappold et al. 2007; Benito-Sanz et al. 2011, 2012), y deleciones de sus regiones reguladoras (*enhancer*) (Benito-Sanz et al. 2005, 2006, 2012). El 30% restante no tiene defecto molecular conocido, por lo tanto es posible que otros *loci*, puedan estar implicados en esta patología.

6.1.2. Displasia mesomélica de langer (DML).

La DML (MIM 249700) se caracteriza por una talla baja desproporcionada severa (-9 a -6 DE), causada por el acortamiento tanto mesomélico como rizomélico de las extremidades (Langer 1967). Además presentan un cúbito y peroné muy poco desarrollados o incluso ausentes, y radio y tibia inusualmente cortos, gruesos y curvados (Langer 1967, Fig. 8).

La DML está causada por defectos en las dos copias del gen *SHOX* o sus regiones reguladoras, ya sea en homocigosis o heterocigosis compuesta. Todos los pacientes con DML tienen defectos en *SHOX* o sus regiones reguladoras (Shears et al. 2002; Zinn et al. 2002; Campos-Barros et al. 2007).

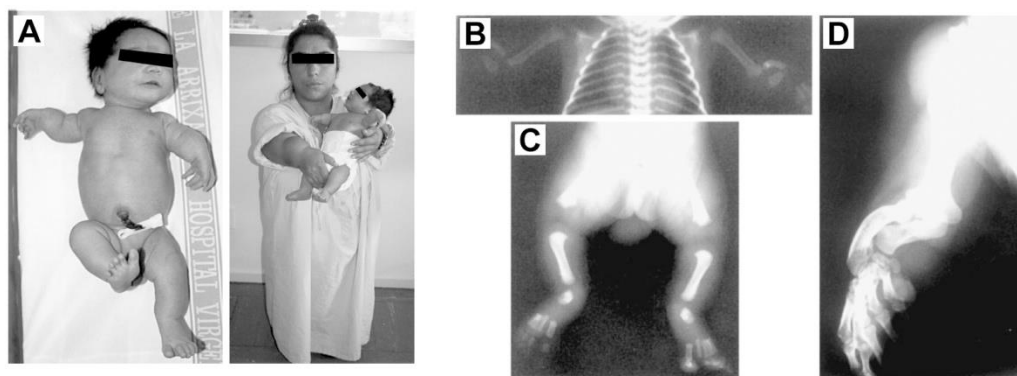


Figura 8. Características clínicas y radiológicas de pacientes con DML. (A) Fotografía del paciente y su madre, ambos con DML. (B) Radiografía de las extremidades superiores del paciente, se puede apreciar el acortamiento del húmero, el acortamiento y curvatura del radio y la hipoplasia del cúbito. (C) Radiografía de las extremidades inferiores del paciente, observamos el acortamiento del fémur y la tibia y la hipoplasia del peroné. (D) Radiografía de la extremidad superior de la madre con DML, muestra un acortamiento severo de húmero, cúbito y radio. Imágenes obtenidas de Shears et al. 2002.

6.1.3. Talla baja idiopática (TBI).

Son diagnosticados con talla baja idiopática (MIM 300582), los pacientes que presentan una estatura por debajo de -2 DE con respecto a su edad, grupo poblacional y sexo, en los que no se ha encontrado ningún trastorno sistémico, endocrino, nutricional o cromosómico asociado (Cohen et al. 2008).

Se ha visto que una pequeña proporción de pacientes con TBI (~2.5%) presenta defectos en heterocigosis en *SHOX* o sus regiones reguladoras (Chen et al. 2009).

6.2. *SHOX2* (*Short stature homeobox 2*)

SHOX tiene un parálogo en humanos, *SHOX2*, con un 83% de homología a nivel de proteína y un homeodominio idéntico (Blaschke et al. 1998). *SHOX2* se expresa en corazón, hígado, pulmón, músculo esquelético, fibroblastos de médula ósea, páncreas y placenta (Blaschke et al. 1998). En humanos, los patrones de expresión de *SHOX* y *SHOX2* se solapan en las extremidades en desarrollo, pero *SHOX2* se expresa más hacia la región proximal-media (Clement-Jones et al. 2000). *SHOX2* se expresa a partir de la cuarta semana de gestación, sobre todo en tejido que rodea el esqueleto (tejido conectivo y musculatura). Dentro de la placa de crecimiento humana, *SHOX2* se expresa en todos los tipos de condrocitos que la componen (Aza-Carmona et al. 2014). En ratón, *Shox2* se expresa en los primordios de las extremidades, en la región proximal, que dará lugar al estilopodio (Yu et al. 2007). Cabe recordar que, al contrario que *SHOX*, *Shox2* sí está presente en ratón.

SHOX2 es capaz de llevar a cabo algunas de las funciones de *SHOX* *in vitro*. Nuestro grupo observó que, al igual que *SHOX*, *SHOX2* es capaz de regular la expresión de *NPPB* (precursor del péptido natriurético tipo B) de forma directa, y de *Agc1* a través del trío SOX (Aza-Carmona et al. 2014). *SHOX* y *SHOX2* son capaces de interactuar entre sí formando heterodímeros, estando las regiones del homeodominio y del OAR de ambos involucradas en dicha interacción (Aza-Carmona et al. 2014). Además, *SHOX* es capaz de recuperar el fenotipo provocado por la falta de *Shox2* en ratones *knock-out* para este gen (Liu et al. 2011).

En cuanto a sus funciones, *Shox2* es clave para la formación correcta de las extremidades (Cobb et al. 2006, Yu et al. 2007). Ratones *knock-out* condicionales *Prrx1-Cre(Shox2)*, en los que *Shox2* es

anulado en las primeras etapas de la formación de las extremidades, muestran acortamiento de las extremidades debido a la hipoplasia del húmero y fémur, estando este último más severamente afectado. Además presentan un acortamiento moderado del zeugopodio de las extremidades posteriores y curvatura de la tibia, fenotipo muy parecido al presentado por pacientes con defectos en *SHOX* (Cobb et al. 2006). *Shox2*, al igual que *SHOX*, interviene promoviendo el paso de condrocitos proliferativos a hipertróficos, ya que el ratón *Prrx1-Cre(Shox2)* muestra sobreexpresión de marcadores de condrocitos inmaduros, como *Sox9*, *Agc1*, y *Col2a1* y una reducción en la expresión de marcadores de hipertrofia como *Col10a1*, *Runx2* y *Ihh* (Cobb et al. 2006; Bobick et al. 2012). *Shox2* juega un papel dual, ya que también promueve la condrogénesis en sus primeras etapas, gracias a que activa la expresión de genes fundamentales, como *Sox9*, y de proteínas características de la MEC, como *Agc1* y *Col2a1* (Bobick et al. 2012). El proceso de regulación de *Shox2* se lleva a cabo a través de dos intermediarios, *Bmp2* y *Bmp4*, puesto que se observó que *Shox2* inhibe la expresión de ambos (Cobb et al. 2007; Bobick et al. 2012).

A diferencia de *SHOX*, *Shox2* lleva a cabo funciones importantes en el desarrollo del corazón y del sistema nervioso. *Shox2* es esencial en la formación de las válvulas senoatriales y en el desarrollo del sistema marcapasos del corazón (Blaschke et al. 2007; Espinoza-Lewis et al. 2009; Puskaric et al. 2010). De hecho, los ratones *knock-out* no condicionales de *Shox2*, mueren durante el desarrollo embrionario debido a defectos cardíacos (Yu et al. 2005; Blaschke et al. 2007). Por otro lado, *Shox2* es necesario para el desarrollo del núcleo motor del nervio facial (VII), cerebelo y los nervios de las extremidades (Vickerman et al. 2011; Rosin et al. 2015a, b).

A pesar de todo, no se han encontrado defectos en *SHOX2* en humanos que puedan relacionarse con alguna patología, probablemente debido a su alta letalidad en las primeras etapas del desarrollo (Yu et al. 2005; Cobb et al. 2006).

6.3. Dianas transcripcionales de SHOX.

Hasta el momento se han descrito cuatro dianas de *SHOX*: *NPPB* (Precursor del péptido natriurético tipo B) (Marchini et al. 2007), *FGFR3* (Decker et al. 2011), *AGC1* (Aza-Carmona et al. 2011) y *CTGF* (Factor de crecimiento de tejido conectivo) (Beiser et al. 2014). *SHOX* es capaz de regular la expresión de las tres primeras dianas de forma directa, mientras que para *Agc1*, *SHOX* necesita colaborar con el trío *SOX*.

***NPPB*:** codifica BNP (Péptido natriurético tipo B), uno de los péptidos natriuréticos, utilizado como marcador biológico para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades vasculares (Suzuki et al; Kragelund et al. 2005). BNP también juega un papel importante en la condrogénesis, ya que ratones que sobreexpresan *Nppb* muestran sobrecrecimiento, placas de crecimiento más largas y defectos óseos como cifosis y cola encorvada (Suda et al. 1998). Sin embargo, el ratón defectivo de *Nppb* (*Nppb*^{-/-}), no muestra defectos esqueléticos, pero sí lesiones fibróticas en los ventrículos (Tamura et al. 2000).

***FGFR3*:** se determinó que *SHOX* es capaz de activar la transcripción de *FGFR3* en células de osteosarcoma humano (U2OS), y de reprimirla en cultivos de micromasa de extremidades de pollo (Decker et al. 2011). Como se ha apuntado previamente, *FGFR3* está implicado en la formación y regulación de la placa de crecimiento y la condrogénesis y es el gen responsable de una serie de displasias incluyendo acondroplasia, hipocondroplasia y craneosinostosis.

AGC1: nuestro grupo observó que SHOX era capaz de interaccionar con SOX5 y SOX6, componentes del trío SOX, y que en esta interacción participaban el homeodominio de SHOX y los dominios HMG de SOX5 y SOX6. Como resultado de esta unión, SHOX es capaz de actuar como un cofactor, provocando un aumento en la activación de la expresión de *Agc1*, una proteína estructural característica de la MEC de cartílago (Aza-Carmona et al. 2011).

CTGF: Recientemente se vio que *SHOX* es capaz de regular la expresión de *Ctgf* mediante estudios con ratones transgénicos que sobreexpresan *SHOX* en condrocitos (Beiser et al. 2014). *Ctgf* es una proteína extracelular que interacciona con factores de crecimiento, integrinas y otras proteínas de la MEC y que juega un papel importante en la remodelación de la MEC y la angiogénesis de la condrogénesis y la placa de crecimiento (Ivkovic et al. 2003).

6.4. Antecedentes previos a nuestra investigación.

Existen grandes indicios para pensar que SHOX puede participar en la formación de la MEC de cartílago a través de la regulación de la expresión de varios de sus componentes principales. Se ha observado que la sobreexpresión de *Shox* en cultivos de micromasa de extremidades de pollo, aumenta los niveles de expresión de *Col2a1* y *Agc1*, componentes de la matriz cartilaginosa (Tiecke et al., 2006). Además nuestro grupo demostró que SHOX regula la expresión de *Agc1*, uno de los componentes mayoritarios de la matriz de cartílago a través del trío SOX (Aza-Carmona et al. 2011). Estos datos llevaron a nuestro grupo a realizar un array de expresión para comparar los niveles de expresión de varios genes característicos de la MEC de cartílago en presencia o ausencia de SHOX. Se observó que los genes *COMP*, *MATN1*, *COL2A1* y *S100A1*, todos dianas del trío SOX e implicados en condrogénesis (Lefebvre et al. 1998; Rentsendorj et al, 2005; Liu et al. 2007; Saito et al. 2007), muestran un aumento de la expresión en presencia de SHOX (+1,66; +2,42; +1,64 y +1,22 veces, respectivamente) (datos no publicados).

Hipótesis

SHOX y SHOX2 podrían jugar un papel importante en la formación de la MEC de cartílago a través de la regulación de genes que codifican sus componentes principales, además existe la posibilidad de que dicha activación se lleve a cabo a través del trío SOX, ya que éste interactúa con ambos. Si esto se confirmara, mutaciones en las regiones reguladoras de los genes regulados por SHOX y SHOX2 podrían ser la causa del fenotipo presentado por pacientes con DLW sin defectos en *SHOX*.

La gran similitud observada entre el fenotipo causado por defectos en homocigosis y heterocigosis en *SHOX* y *NPR2*; nos lleva a pensar que defectos en *NPR2* que codifica el receptor NPR-B y *NPPC* que codifica CNP, su ligando, también podrían ser los responsables del fenotipo observado en pacientes con sospecha de DLW o TBI sin alteraciones en *SHOX*.

Objetivos

1. Identificar y caracterizar la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión de los genes de la MEC de cartílago: *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1*.
2. Búsqueda de defectos en los promotores de los genes regulados por SHOX en pacientes con discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) y talla baja idiopática (TBI), sin defectos en SHOX, y confirmación de la patogenicidad de las variantes encontradas mediante estudios funcionales.
3. Determinar si mutaciones en los genes *NPR2* y *NPPC*, que codifican el receptor NPR-B y CNP, su ligando, respectivamente, pueden explicar el fenotipo de los pacientes con sospecha de DLW y TBI, sin defectos en *SHOX*. Posteriormente se confirmará la patogenicidad de las variantes encontradas mediante estudios funcionales.

Materiales y Métodos

1. Cultivos celulares.

En la realización de esta tesis se utilizaron tres líneas celulares: U2OS, C3H/10T1/2 y COS-7.

Células U2OS (*Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells*): Se cultivaron a partir de tejido óseo de la tibia de una paciente de 15 años que presentaba un osteosarcoma moderadamente diferenciado (J. Ponten y E. Saksela 1964). Estas células han sido ampliamente usadas en estudios funcionales de SHOX (Marchini et al. 2007; Aza-Carmona et al. 2011, 2014; Decker et al. 2011).

Células C3H/10T1/2: Son células mesenquimales, indiferenciadas, que proceden de embrión de ratón C3H (Reznikoff et al. 1972).

Células COS-7 (*African Green Monkey Cercopithecus aethiops Fibroblast-like Kidney Cells*): Son células con morfología similar a los fibroblastos, que fueron establecidas a partir de tejido procedente del riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

Se usaron las mismas condiciones para las tres líneas celulares. Las células fueron mantenidas con DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de FBS (Suero Fetal Bovino, Life Technologies) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Life Technologies), en un incubador a 37°C y con un 5% de CO₂. Para los ensayos de simulación de la condrogénesis en células C3H/10T1/2, se añadió al medio BMP2, que induce la condrogénesis, o Nog, su antagonista, a una concentración de 100 ng/ml y 50 ng/ml respectivamente.

2. Pacientes.

Se utilizaron un total de 242 pacientes con sospecha DLW y 95 con TBI, ambos sin defectos en SHOX o sus regiones reguladoras. Los pacientes incluidos en el grupo de sospecha de DLW debían presentar al menos dos de las siguientes características: 1) Talla inferior a -2 DE (Carrascosa et al. 2008); 2) Deformidad de Madelung; 3) Acortamiento mesomélico de las extremidades y 4) Presencia de una o varias características clínicas secundarias propias de la deficiencia de SHOX, como son las recogidas en la Tabla 1 (Rappold et al. 2007). Se determinaron las proporciones antropométricas: Envergadura/Talla (E/T) y Talla sentado/Talla (TS/T), y fueron clasificados como desproporcionados si <0.965 y >0.555, respectivamente, de acuerdo con lo establecido para la deficiencia de SHOX (Rappold et al. 2007).

Los pacientes con TBI debían presentar una talla inferior a -2 DE, niveles de GH e IGF normales y crecimiento proporcionado. El estudio fue aprobado por el comité ético de las instituciones donde se realizó y todos los pacientes dieron su aprobación mediante un consentimiento informado. Las características de nuestras cohortes de estudio, incluyendo los datos clínicos y antropométricos, así como de edad y sexo de los pacientes, están resumidas en la tabla 3.

A todos los pacientes se les realizó una búsqueda exhaustiva de defectos en SHOX y sus regiones reguladoras. Para ello se usaron las siguientes técnicas: un MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) comercial (P018E1/F1/ G1, MRC Holland, Holanda), un MLPA de diseño casero que cubre al gen SHOX y sus regiones reguladoras, y HRM (*High Resolution Melting*) y secuenciación de las regiones codificantes y de transición intrón-exón de SHOX (Benito-Sanz et al. 2006a; 2006b y 2011). El

MLPA permite la detección de grandes deleciones y duplicaciones, mientras que el HRM y secuenciación buscan pequeñas deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales.

Tabla 3. Características clínicas y antropométricas de las cohortes de DLW y TBI.

Características clínicas o antropométricas	DLW (n=242)			TBI (n=96)	
	Hombres (n=104)	Mujeres (n= 138)	Todos (n=242)	Hombres (n=38)	Mujeres (n=58)
Edad±DE (Años) y rango	9,0±3,8 (1,0-17,0)	10,3±5,9 (1,0-42,0)		9,6±3,8 (1,3-15,4)	9,8±4,9 (2,0-38,0)
Talla±DE y rango	-2,5±0,8 (-5,2- -0,2)	-2,6±0,8 (-4,7- +0,7)		-2,8±0,5 (-3,8- -2,0)	-2,6±0,5 (-3,5- -2,0)
Ratio E/T±DE y rango	0,97±0,03 (0,90-1,07)	0,97±0,04 (0,88-1,08)			
Ratio TS/T±DE y rango	0,54±0,05 (0,43-0,72)	0,53±0,03 (0,44-0,63)			
IMC±DE y rango	17,7±3,4 (13,7-28,2)	18,6±3,7 (11,9-29,3)		17,8±3,8 (13,6-29,6)	17,3±2,9 (10,3-26,4)
Acortamiento mesomélico de las extremidades	60	58	118 (48,8%)		
Deformidad de Madelung	15	33	48 (19,8%)		
Triangulación de la epífisis del radio	17	31	48 (19,8%)		
Curvatura del radio	28	45	73 (30,2%)		
Cúbito valgo	19	33	52 (21,5%)		
Paladar hendido	19	26	45 (18,6%)		
Acortamiento del 4º metacarpo	12	25	37 (15,3%)		
Hipertrofia muscular	17	28	55 (22,7%)		
Micrognatia	9	8	17 (7,0%)		

3. Muestras control de ADN.

Se utilizaron 264 controles sanos de procedencia española del Banco de ADN de la Universidad de Salamanca, España. Todos presentan una talla normal, entre -2 y +2 DE.

4. Modelos animales (ratones).

Se utilizaron dos líneas de ratones *knock-out* condicionales, en las que *Shox2* está ausente en las extremidades exclusivamente, ya que el ratón *knock-out* es letal (Yu et al. 2005). Para generarlos, se cruzaron machos con un alelo de *Shox2* silvestre y el otro deleciónado, y con el transgen *Col2a1-Cre* o *Prrx1-Cre*, con hembras que tenían los dos alelos de *Shox2* floxeados. De esa forma, los ratones *knock-out* son positivos para Cre y portadores de un alelo de *Shox2* defectivo. Los alelos alterados de *Shox2* (Cobb et al. 2006) y los transgenes de *Prrx1-Cre* (Logan et al. 2002; Cobb et al. 2006) y *Col2a1-Cre* (Bobick et al. 2012), fueron descritos previamente. El fondo genético de los ratones utilizados es C57BL/6-129/Sv. Se consideró como E0.5 a las 12 horas del día en el que se formó el tapón vaginal. Los mutantes se compararon con miembros control de la misma camada, que presentan una copia funcional de

Shox2. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité del Cuidado de los Animales de las Ciencias de la Vida y Medioambiente de la Universidad de Calgary (AB, Canadá).

5. Cultivos de Micromasas.

Los cultivos de micromasas se crearon a partir de células de miembros enteros de embriones E11.5 de ratón. Se siguió el protocolo descrito previamente (Hoffman et al. 2006; Woods et al. 2005), con algunas modificaciones. Una vez los miembros fueron extraídos, sus células fueron disociadas y llevadas a una concentración de $\sim 1.5 \times 10^7$ células/ml en un medio compuesto de F12 Nutrient Mixture y high-glucose DMEM que contenía GlutaMAX y piruvato sódico (Life Technologies), con una proporción de 3:2, suplementado con 10% FBS (Life Technologies) y Normomicina a una concentración de 100mg/ml (InvivoGen, San Diego, CA). Para formar las micromasas, se depositaron gotas de 10 μ l de las células disociadas, en placas de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Después de 60 minutos, se llenaron los pocillos con 700 μ l de medio suplementado con 50 mg/ml de ascorbato (Sigma-Aldrich, San Louis, MO).

6. Plásmidos.

Los plásmidos de expresión: pHA-SOX9 (NM_000346), pHA-SHOXa (NM_000451) y pHA-SHOX2a (NM_006884.3), marcados con el péptido señal HA, y sus mutantes, fueron creados con anterioridad por otros miembros del grupo (Aza-Carmona et al. 2011; 2014).

El plásmido de expresión pHA-SOX6, que presenta una variante de *splicing* sin el exón 9 y con el exón 14a característica de condrocitos (Cohen-Barak et al, 2001), fue donado por el Dr. T. Ikeda. Los vectores pHA-NPR-B silvestre (NM_003995) y pHA-NPR-B con la mutación p.Arg110Cys fueron donados por el Dr. Amano y el Dr. Hasegawa (Hachiya et al. 2007). El vector de luciferasa 4x48-p89Col2a1, que contiene el promotor mínimo de *Co2a1* (desde -89 a +6 pb del inicio de la transcripción) y cuatro copias de su región *enhancer*, con la que interacciona el trío SOX, fue cedido por la Dra. Lefebvre (Lefebvre et al. 1997) (Tabla 4). El vector pGEMT-Easy con el ADNc de *Agc1*, utilizado para crear la sonda de la hibridación *in situ* fue donado por el Dr. Cobb.

El vector de expresión pMYC-CNP (NM_024409), con el DNAC de *NPPC* marcado con el péptido señal Myc, y el vector pRED-CALR (calreticulina), un marcador del retículo endoplásmico; fueron obtenidos de forma comercial (Origene Technologies Inc, Rockville, MD). El vector de control de luciferasa pRL-SV40 también fue obtenido de forma comercial (Promega, Madison, WI).

El resto de los plásmidos utilizados en este trabajo fueron diseñados y construidos siguiendo un proceso de clonación y subclonación (Tabla 5, Anexo I).

6.1 Clonación.

La técnica comienza con la amplificación del fragmento a clonar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se utilizaron dos técnicas distintas dependiendo del tamaño del fragmento:

Para tamaños mayores de 1,5 kb: Se utilizó el kit Expand Long Range dNTPack (Roche, Madison, WI), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con la intención de asegurar la adición de desoxiadenosinas a los extremos 3' de los amplicones, se realizó una segunda PCR de solo cinco ciclos, añadiendo 2U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) al producto de la primera PCR, y siguiendo el siguiente protocolo: 94°C durante 10 minutos; 5 ciclos de 96°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto y 72°C durante 8 minutos; y por último una extensión final de 8 minutos a 72°C.

Tabla 4. Construcciones utilizadas en los ensayos de luciferasa.

Gen e isoforma	Vector	Tamaño de la región clonada (pb)	Posición* (pb)	Especie utilizada
<i>Matn1</i> NM_001030375	pGL3-Basic	2128	-2074 a +54	<i>G. gallus</i>
<i>MATN1</i> NM_002379	pGL3-Basic	3889	-3766 a +123	<i>H. sapiens</i>
<i>Comp</i> NM_016685	pGL3-Basic	1920	-1902 a +18	<i>M. musculus</i>
<i>mir-140</i> NM_025830	pGL3-Basic	1026	-1026 a +1	<i>M. musculus</i>
<i>S100A1</i> NM_006271	pGL3-Basic	1016	-1016 a +1	<i>H. sapiens</i>
<i>Col2a1</i> ** NM_031163	pLuc4	188	4x(+2187 a +2234)	<i>M. musculus</i>

*La posición se determinó respecto al comienzo de la traducción (+1) de cada gen. ** Vector cedido por la Dra. Lefebvre (Lefebvre et al. 1997).

6.1 Clonación.

La técnica comienza con la amplificación del fragmento a clonar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se utilizaron dos técnicas distintas dependiendo del tamaño del fragmento:

Para tamaños mayores de 1,5 kb: Se utilizó el kit Expand Long Range dNTPack (Roche, Madison, WI), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con la intención de asegurar la adición de desoxiadenosinas a los extremos 3' de los amplicones, se realizó una segunda PCR de solo cinco ciclos, añadiendo 2U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) al producto de la primera PCR, y siguiendo el siguiente protocolo: 94°C durante 10 minutos; 5 ciclos de 96°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto y 72°C durante 8 minutos; y por último una extensión final de 8 minutos a 72°C.

Para tamaños inferiores a 1,5 kb: Se llevó a cabo una PCR clásica, con las siguientes condiciones: 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems), 2.5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 2 U de Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 0.2 mM de dNTPs (Roche), 0.4 mM de cada oligonucleótido, 100 ng de ADN, en un volumen final de 50 µl. Se añadió 5% de DMSO (Sigma-Aldrich) si el fragmento amplificado presentaba un porcentaje de GC superior a 60%. Se siguió el siguiente protocolo de amplificación: 10 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa; 37 ciclos de 95°C durante 40 segundos, 65°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 minuto; y por último una extensión final de 8 minutos a 72°C.

La adición de desoxiadenosinas en los extremos 3' del inserto permite su clonación directa en un vector pCR2.1, para ello se utilizó el kit TA cloning Dual promoter (Life Technologies). Se llevó a cabo una ligación del inserto y el vector pCR2.1 con una proporción inserto:vector de 3:1, usando la enzima T4 ligasa (Life Technologies), y se incubó toda la noche a 14°C.

Los cebadores utilizados se diseñaron para, además de amplificar la región de interés, añadir la secuencia de dianas de enzimas de restricción específicas, y así hacer posible el proceso de subclonación en el vector final (Tabla 5, Anexo I).

El vector pCR2.1 con el inserto, fue transformado en bacterias *E. coli* competentes HB101 (Promega). Se mezclaron 45 µl de bacterias, con 5 µl de vector y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después se les sometió a un choque térmico de 35 segundos a 42°C y se devolvieron rápidamente al hielo, donde fueron incubadas durante 2 minutos. Se añadieron 250 µl de medio LB [(triptona 1% (Panreac Química, España), extracto de levadura 0,5% (Panreac Química) NaCl 1% (Sigma Aldrich)], Mg₂SO₄ 0.25% (Sigma Aldrich) y se incubaron a 37°C durante 1 hora, con agitación. Por último, las bacterias se sembraron en placas de LB con agar al 1.5% (Panreac Química) y ampicilina a 50 µg/ml (Normon, España) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Se seleccionaron algunas colonias y se crecieron en 8 ml de LB con ampicilina 100 µg/ml, durante toda la noche. Al día siguiente, se extrajo el ADN de las bacterias utilizando el kit Jetquick Plasmid Miniprep Spin (Genycell Biotech, España). Para comprobar que no se ha introducido ningún cambio en la secuencia original, los plásmidos fueron secuenciados usando el terminador BigDye V3.1 (Applied Biosystems). Las secuencias resultantes se analizaron con el programa Sequencher 5.10 (GeneCodes, Ann Arbor, MI).

6.2 Subclonación.

Una vez confirmada la presencia del inserto se procedió a la subclonación en el vector final, pGL3Basic (Promega). Se llevó a cabo una digestión del pCR2.1 con nuestro inserto y del pGL3Basic vacío, durante 3 horas, utilizando las enzimas incluidas durante la primera PCR. Los distintos fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, los fragmentos correspondientes al inserto y al vector pGL3Basic se extrajeron y purificaron con el kit Gel extraction QIAquick (Qiagen, Países Bajos). Por último, el inserto y el vector pGL3Basic fueron ligados usando una proporción de 10:1 de inserto:vector, usando el kit LIGATE-IT Rapid Ligation (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Los siguientes pasos son idénticos a los del proceso de clonación, el vector ligado se transformó y se sembró en placas. Al día siguiente, se seleccionaron algunas colonias y se dejaron crecer. Por último, se secuenciaron para ver que el inserto se encuentra en la posición adecuada dentro del vector y no presentan ningún cambio en su secuencia.

Para la creación de sondas de hibridación in situ, se hizo una clonación directa de inserto en el vector pGEM-T Easy (Promega), gracias a la adición de desoxiadenosina a los extremos 3' del inserto amplificado.

6.3 Mutagénesis.

Los mutantes utilizados en los estudios funcionales fueron creados por mutagénesis dirigida, utilizando el kit Quick Change Site directed mutagenesis (GE Healthcare, Reino Unido). La técnica se basa en la incorporación del cambio directamente en el vector, gracias a su amplificación utilizando

oligonucleótidos complementarios con la mutación en su secuencia (Tabla 6, Anexo I). Para ello, se llevó a cabo una PCR con las siguientes condiciones: 1x de Buffer de reacción, 0,5 µl dNTPs, 125 ng de cada oligonucleótido, 1,5 µl de QuickSolution, 10 ng/µl del plásmido de interés y 0,5 µl de Pfu Turbo ADN polimerasa (GE Healthcare); y se siguió el siguiente protocolo: 95°C durante 1 minuto; 18 ciclos de: 95°C durante 50 segundos, 60°C durante 50 segundos y 1 minuto por cada kb de plásmido; y por último, una extensión final de 7 minutos a 68°C. El producto de la PCR fue tratado con DpnI (1U) (GE Healthcare) durante 1 hora a 37°C, para digerir el plásmido molde y dejar únicamente el que presenta el cambio.

El vector amplificado fue transformado en células ultracompetentes XL 10-Gold (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se seleccionaron varias colonias y se secuenciaron para confirmar la presencia de la mutación.

7. Transfección.

Se utilizó el reactivo Eugene 6 (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de la transfección, las células fueron sembradas y dejadas crecer durante 24 horas. Después se les cambió el medio de cultivo por medio fresco y se añadió el Eugene, que previamente había sido incubado con los plásmidos a transfectar durante 20 minutos. Las cantidades de vector y de Eugene utilizadas varían según el tipo celular y el tipo placas (Tabla 7). Una vez transfectadas, se dejaron crecer durante 24 o 48 horas, hasta su lisis.

Tabla 7. Condiciones de transfección de las líneas celulares utilizadas.

Línea celular	Ratio de transfección (µg ADN:µl FuGene)	Cantidad total de ADN (µg)	Tipo de placas (pocillos)	Cantidad de células (por pocillo)
U2OS	2:1	2,25	24	45.000
C3H/10T1/2	3:1	1,0	12	60.000
COS-7	3:2	1,0	12	100.000

8. Ensayo de Luciferasa.

El ensayo de luciferasa nos permite cuantificar la capacidad reguladora de la transcripción de determinadas regiones genómicas, gracias a que dichas regiones van a controlar la expresión del gen de la luciferasa. La técnica comenzó con la siembra de células U2OS en placas de 24 pocillos (Costar, Washington, DC). A las 24 horas, las células fueron transfectadas y 48 horas después, se procedió a su lisis. Para ello se añadieron 250 µl de 1x PLB (*Passive Lysis Buffer*, Promega) a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos, a temperatura ambiente y con agitación. Las muestras fueron trasladadas a tubos Eppendorf, se centrifugaron a 14.000 rpm durante un minuto y se recogió el sobrenadante.

Se midió la actividad luciferasa de los lisados siguiendo las recomendaciones del kit Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega). Las muestras se midieron por triplicado con el lector Infinite M200 NanoQuant (TECAN, Suiza), utilizando un tiempo pre-lectura de 1-2 segundos y un tiempo de lectura de 10 segundos. Los datos obtenidos se normalizaron; en primer lugar con respecto a la actividad de

luciferasa de renilla, el control de transfección; y en segundo lugar con respecto a las células transfectadas con el vector vacío. Se realizaron tres réplicas totalmente independientes de cada experimento.

9. PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa se utiliza para analizar la expresión génica de los genes de interés. Se analizó la expresión endógena de determinados genes en muestras de sangre de pacientes y controles, en células C3H/10T1/2 y en cultivos de micromasas de células obtenidas de las extremidades superiores de embriones de ratón.

El ARN de pacientes y controles fue extraído directamente de la sangre circulante, utilizando tubos PAXgene Blood RNA (Qiagen) y el kit PAXgene Blood RNA (Qiagen). El ARN fue retrotranscrito a ADNc usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las células C3H/10T1/2 fueron sembradas en placas de 12 pocillos (Costar), tras 24 horas fueron transfectadas y 48 horas después, lisadas. Para su lisis y extracción de ARN se utilizó el kit RNAeasy Mini (Qiagen). Para la síntesis de ADNc a partir de ARN se usó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies).

Los cultivos de micromasas fueron sembrados en placas de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific) y lisados 72 horas después. Para su lisis y extracción de ARN se utilizó el kit E.Z.N.A. Total RNA (Omega Bio-Tek, Norcross, GA). El ARN fue retrotranscrito usando el kit qScript cDNA SuperMix (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD).

Los niveles de expresión endógenos fueron determinados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1x SYBR Premix Ex Taq (Tli RNase Plus) (Takara, Japón), 0,5mM de cada cebador, 1x ROX Reference Dye (Takara), 20 ng de muestra en un volumen de 10 µl. Se siguió el siguiente protocolo de amplificación: 30 segundos a 95°C y 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos (en los que se llevó a cabo la lectura de datos). Se utilizó un termociclador de real-time ABI7900HT (Life Technologies). Los niveles de expresión relativa de cada gen se calcularon utilizando el método de las curvas estándar y fueron normalizados con respecto a los niveles de expresión de los genes constitutivos *Actb* (Actina tipo β) y *Tbp* (*TATA box binding protein*). Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran recogidas en la tabla 8 (Anexo I).

10. Hibridación *in situ*.

Esta técnica se usa para analizar la expresión espacial de los genes de interés. Se realizaron hibridaciones *in situ* con cortes de extremidades superiores de embriones de ratón E13.5 y E14.5, utilizando sondas de ARNm antisentido contra *Comp*, *Matn1* y *Acan*.

10.1 Preparación de los cortes histológicos.

Las hembras gestantes fueron diseccionadas al mediodía, sus embriones fueron extraídos y puestos inmediatamente en PBS (Tampón fosfato salino) frío, cada uno en un pocillo de una placa de 24

pocillos (Thermo Fisher Scientific). Los embriones fueron fijados durante toda la noche con 4% paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich), a 4°C y con agitación. Se eliminó cualquier resto de PFA, con tres lavados de 30 minutos con PBS (Biochrom AG, Alemania), también con agitación y a 4°C. Después, los embriones se incubaron con 30% de sacarosa en PBS, a 4°C y con agitación, durante una noche como mínimo.

Se procedió a diseccionar las extremidades superiores de cada embrión, para después sumergirlas en un molde con medio de congelación de tejidos (Leica, Alemania). Se dejaron congelar durante al menos 24 horas a -20°C y se seccionaron con el criotomo CM1950 (Leica), haciendo cortes de 10 µm de grosor. Los cortes se guardaron a -80°C hasta su uso.

10.2 Obtención de las sondas de ARNm antisentido.

Una vez el inserto, con la secuencia de parte del ADNc del gen a analizar, ha sido amplificado y clonado en el vector pGEMT-Easy, se procedió a la síntesis de la sonda de ARNm antisentido. Se linealizaron 5 µg del plásmido utilizando la enzima apropiada y digiriendo durante toda la noche. El plásmido linearizado fue purificado con el kit de extracción QIAEX (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para sintetizar las sondas marcadas con digoxigenina, se mezclaron 700 ng del plásmido linealizado, 1x DIG RNA labeling mix (Roche), 1x transcription buffer (Promega), 100 mM de DTT (Promega), 1 µl de RNAsin inhibidor de la ARNasa (Promega), 40 unidades de T7 o SP6 ARN polimerasa (Promega) en un volumen final de 20 µl. Se incubó 2 horas a 37°C y se paró la reacción añadiendo 1 µl de EDTA 0.5M a pH 8.0.

Las sondas fueron purificadas usando columnas G-50 Microspin (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se confirmó la correcta síntesis de las sondas corriendo 2 µl de muestra en un gel de agarosa al 1.5%.

10.3 Hibridación *in situ*.

Los cortes se dejaron descongelar durante media hora a temperatura ambiente. Después fueron incubados con la sonda diluida 1/200 en medio de hibridación (50% formamida deionizada, 50% heparán sulfato, 1 mg/ml de ARNr y 1x Denhardt's (Sigma-Aldrich)), durante toda la noche, a 65°C y en humedad.

Se hicieron dos lavados de 30 minutos con solución de lavado (50% de formamida, 1X de SSC y 5 ml de Tween (Sigma-Aldrich)), a 65°C y otros dos con 1x MABT (1x de Buffer de ácido maleico, 1% Tween y agua mili-Q) durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación. Los cortes fueron bloqueados en 1x MABT, 2% de medio de bloqueo (Boehringer, Alemania) y 20% de FBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubó con el anticuerpo anti-DIG con actividad fosfatasa alcalina (Roche) diluido 1/2500 en 1x MABT, 20% de FBS, durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se lavaron 5 veces con 1x MABT, con agitación, cada lavado de 20 minutos de duración. Después se lavaron 2 veces con NTMT (NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tris-Cl 100 mM a pH 9.5 y 10% Tween) durante 10 minutos y con agitación. Las muestras se tiñeron con 200 µl por

muestra de BM purple (Sigma-Aldrich), se cubrieron con parafilm y se dejaron incubar hasta que la tinción fue visible. Se paró la reacción sumergiendo las muestras en agua y se dejaron secar. Una vez secas, se procedió a su montaje. Las muestras fueron analizadas con un Estereomicroscopio Leica MZ12.5 (Leica Microsystems).

11. Búsqueda de mutaciones.

Se llevó a cabo una búsqueda de mutaciones en las regiones codificantes y las regiones de unión intrón-exón de los genes *NPR2* y *NPPC* y del promotor de *MATN1*, en 242 pacientes con sospecha DLW y 95 con TBI, sin defectos en SHOX.

11.1 Extracción de ADN.

El ADN genómico utilizado fue extraído de la sangre periférica de los pacientes y controles utilizando el kit Blood Core (Qiagen) o Chemagic DNA extraction special (Chemagen, Perkin Elmer Inc, Alemania).

11.2 High Resolution Melting (HRM).

Esta técnica se basa en el análisis de comportamiento del ADN cuando es sometido a un proceso de desnaturalización por temperatura. Con el HRM podemos determinar la presencia de mutaciones en heterocigosis debido a que estas cambian la forma de la curva de fusión. Para poder visualizar los cambios utilizamos Green Plus⁺ (Biofire diagnostics, Salt Lake City, UT), un agente fluorescente que se une específicamente a ADN de doble banda.

Previo al análisis por HRM, se llevó a cabo una PCR de amplificación. Se usaron las siguientes condiciones: 1X MegaMIXgold (Microzone, Reino Unido), 250 nM de cada oligonucleótido (Tabla 9, Anexo I), 20 ng de ADN genómico y 1X LC Green Plus⁺ (Biofire diagnostics) en un volumen total de 10 µl. Se siguió el siguiente protocolo: 95°C durante 5 minutos; 44 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, X°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; y un ciclo de: 72°C durante 8 minutos, 94°C durante 30 segundos y 25°C durante 30 segundos, donde X indica la temperatura de anillamiento (Tabla 9, Anexo I).

Una vez las muestras han sido amplificadas, éstas son analizadas usando un LightScanner HR96 (Biofire diagnostics) que crea un gradiente de temperatura que provoca la desnaturalización progresiva del ADN, formando una curva de fusión, que es específica de cada secuencia.

11.3 Secuenciación Sanger.

Las muestras que mostraron curvas de fusión distintas a los controles fueron secuenciadas por el método Sanger. Se usó el terminador BigDye v3.1 (Applied Biosystems) con los mismos oligonucleótidos utilizados en la amplificación previa (Tabla 9, Anexo I). La mezcla de reacción consistió en: 1 µl de BigDye V3.1 (Applied Biosystems), oligonucleótido 0,5 µM y 1,5 µl de producto amplificado y purificado mediante EXO-SAP-IT (GE Healthcare), en un volumen final de 5 µl. Se siguió el siguiente protocolo: 3 minutos a 94°C, 25 ciclos de: 96°C durante 20 segundos, 55°C durante 15 segundos y 60°C

durante 4 minutos, y 5 minutos a 72°C. Posteriormente, las muestras fueron purificadas mediante CleanSEQ (AgenCourt) y secuenciadas con el secuenciador ABI13730XL (Applied Biosystems).

11.4 Next generation sequencing (NGS).

Para las muestras analizadas por NGS, se utilizó un panel de displasias esqueléticas (SkeletalSeq.V3) que nos permitió analizar 315 genes y regiones relacionadas con estas patologías. Se usó el kit de creación de librerías y enriquecimiento SeqCap EZ (Roche Nimblegen) y las muestras fueron secuenciadas con la plataforma MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA). El análisis bioinformático fue llevado a cabo por duplicado: por el departamento de bioinformática del INGEMM y por nuestro grupo, usando la herramienta Illumina variant Caller V2.1 (Illumina Inc.). Las variantes encontradas mediante NGS fueron posteriormente confirmadas mediante secuenciación Sanger.

12. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se utilizó la técnica de ELISA para medir los niveles de GMPc intracelulares de células en cultivo, y de CNP y GMPc en el plasma sanguíneo de los pacientes.

Para obtener el plasma sanguíneo, se extrajo la sangre circulante de los pacientes y controles, y se recogió en tubos K2E EDTA (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ). Se centrifugó a $1.600 \times g$ y 4°C, durante 15 minutos. El plasma obtenido fue alicuotado y guardado a -80°C.

Para cultivos celulares, se sembraron células COS-7 en placas de 12 pocillos (Costar), a las 24 horas fueron transfectadas. A las 48 horas, se las incubó durante 20 minutos con 100nM de CNP-22 (Bachem, Suiza) o 1µM de BNP-32 (Bachem) en DMEM, durante 20 minutos. Inmediatamente después fueron lisadas con HCl 0,1M. Los lisados fueron centrifugados a $600 \times g$ durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C.

Se analizaron los niveles de GMPc, usando el kit cGMP Complete ELISA kit (ENZO Life Sciences Inc, Farmingdale, NY); de CNP-22 usando el kit CNP-22 EIA (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA) y de NT-proCNP usando el kit NT-proCNP ELISA (Biomedica Medizinprodukte, Austria); siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Se hicieron al menos dos réplicas biológicas de cada experimento.

13. Inmunocitoquímica.

Para esta técnica se utilizaron células U2OS que sobreexpresan, de forma transitoria, NPR-B silvestre o los mutantes encontrados, y el marcador de retículo endoplasmático CALR (calreticulina) marcado con proteína roja fluorescente. Se sembraron un total de 65.000 células U2OS directamente en portaobjetos (BD Clontech, Mountain View, CA), se dejaron crecer durante 24 horas para después ser transfectadas. A las 24 horas, se extrajo el medio de cultivo y se lavaron con PBS Dulbecco (Biochrom AG) durante 5 minutos. A continuación se procedió a la fijación de las células con PFA al 4% disuelto en tampón fosfato 0,1M a pH 7.2, durante 20 minutos. Después se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Las células fueron bloqueadas durante 30 minutos con tampón de bloqueo (1% de BSA (Sigma-Aldrich),

2,2% de glicina (Sigma-Aldrich) y 0,2% de Tween (Sigma-Aldrich) en PBS Dulbecco). Se incubaron con el anticuerpo primario Anti-HA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1/2000 diluido en BSA-Tween (1% BSA (Sigma-Aldrich), 0,2% Tween en PBS Dulbecco), durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas 3 veces con 0,2% Tween en PBS Dulbecco durante 5 minutos y fueron incubadas con el anticuerpo secundario, Alexa fluor 488 (Life Technologies) a una concentración de 1/2000 durante 1 hora y en oscuridad. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 0,2% Tween en PBS en oscuridad. Se tiñeron los núcleos con diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) durante 2 minutos a 37°C, en oscuridad y se repitieron los 3 lavados de 5 minutos. Por último, se montaron las muestras con DePeX (BDH, Merck Chemicals Ltd, Reino Unido). Todo el proceso fue llevado a cabo a temperatura ambiente y con agitación, salvo cuando sea indicado. Las muestras fueron visualizadas con un microscopio fluorescente Leica DM5500 B (Leica Microsystems). Se llevaron a cabo dos réplicas biológicas para cada mutante.

14. Herramientas bioinformáticas.

14.1 Análisis de la patogenicidad *in silico*.

Se llevó a cabo un análisis de la patogenicidad *in silico* utilizando la herramienta Alamut V2.6-1 software (Interactive Biosoftware, France), que compara los resultados obtenidos por cuatro bases de datos:

Mutation taster: utiliza un clasificador bayesiano basado en los datos de *1000genomes* y nombra cada variante como polimorfismo o patogénica y le da un valor de probabilidad de predicción (entre 0 y 1, cuanto mayor sea el valor, más seguridad tendrá la predicción) (<http://www.mutationtaster.org/>).

SIFT: estudia la conservación evolutiva de la variante y en base a eso le asigna una probabilidad, valores por <0,05 son clasificados como deletéreos y valores \geq 0,05 como tolerados (<http://sift.jcvi.org/>).

PolyPhen: utiliza un clasificador bayesiano ingenuo que se basa en cómo encaja la variante en la secuencia de aminoácidos comparado con la secuencia de proteínas homólogas, cuanta diferencia hay entre la proteína con el cambio y la silvestre, y si el cambio afecta a un sitio hipermutable. Da a la variante un valor entre 0 y 1, las variantes con valores próximos a 0 serán clasificadas benignas y las que tengan valores próximos a 1, como deletéreas (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

CADD v1.3 (Combined Annotation Dependent Depletion): Analiza todas los SNVs (*Single nucleotide variants*) descritas y las clasifica según su patogenicidad dándolas un valor entre 0 y 99, por ejemplo, el 10% de las variables más patogénicas serán clasificadas con valores entre 10 y 20, el 1% entre 20 y 30, el 0,1% entre 30 y 40, etc. Valores por debajo de 15 serán considerados como polimorfismos, entre 15 y 20 como de significado incierto, y por encima de 20 como posiblemente deletéreos (<http://cadd.gs.washington.edu/info>).

Por otro lado, Alamut V2.6-1 nos aporta datos sobre la conservación del aminoácido en diferentes especies de vertebrados.

14.2 Estudios de frecuencias poblacionales.

Las frecuencias en la población de las variantes encontradas fueron determinadas utilizando la base de datos del *Exome Aggregation Consortium* (ExAc), que cuenta con los exomas de más de 60.000 individuos de diferentes poblaciones. Para las regiones no codificantes se usó la base de datos *1000genomes*.

14.1 Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos llevados a cabo en este trabajo consistieron en Pruebas *t* de Student para dos variables independientes y se utilizó el programa SPSS 15.0 para Windows. Se consideró significativo si el p-valor obtenido era inferior a 0.05.

Resultados

1. Implicación de SHOX y SHOX2 en la regulación de la formación de la matriz extracelular de cartílago.

Estudios previos han demostrado que SHOX puede regular la expresión de sus dianas mediante dos mecanismos, de forma directa, como es el caso de *FGFR3*, *NPPB* y *Ctgf* (Marchini et al. 2007; Decker et al. 2011; Beiser et al. 2014), o de forma indirecta, a través del trío SOX, como ocurre con *Agc1*, una proteína de la MEC de cartílago (Aza-Carmona et al. 2011).

El trío SOX juega un papel fundamental en la regulación de las proteínas de la MEC, ya que se ha demostrado que es capaz de modificar la expresión de varios genes relacionados con ella, como son *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *Agc1*, *miR-140* y *S100A1* (Lefebvre et al. 1998; Rentsendorj et al. 2005; Liu et al. 2007; Saito et al. 2007; Han et al. 2008; Yamashita et al. 2012). Recientemente, nuestro grupo observó que la sobreexpresión de SHOX provocaba una activación de la expresión de *COMP*, *MATN1*, *COL2A1* y *S100A1* mediante arrays de expresión en células U2OS (datos no publicados). Por lo tanto, existe la posibilidad de que SHOX regule dichos genes de forma directa o a través del trío SOX.

Por otro lado, SHOX tiene un homólogo, SHOX2. Nuestro grupo demostró que SHOX y SHOX2 pueden llevar a cabo funciones similares, ya que ambos son capaces de activar la expresión de *Agc1* a través del trío SOX y *NPPB* de forma directa (Aza-Carmona et al. 2014). Además, estudios *in vivo* demostraron que *Shox2* regula la expresión de varias proteínas de la MEC a través de los genes *Bmp*, como ocurre con *Agc1* y *Col2a1* (Bobick et al. 2012). Por lo tanto, es posible que SHOX también sea capaz de regular la expresión de los componentes de la MEC a través de los genes *Bmp*.

1.1. Estudio del papel de SHOX y SHOX2 en la regulación de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1* de forma directa.

1.1.1 Estudio de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1*.

Se analizó el efecto de SHOX y SHOX2 en la regulación de los genes estudiados; para ello, el gen reportero de la luciferasa se dispuso bajo el control de la región reguladora de cada gen, y se buscaron diferencias entre células con y sin SHOX o SHOX2. Se observó que SHOX y SHOX2 son capaces de activar la expresión de *Matn1*, *Col2a1* y *S100A1* de forma significativa, pero no son capaces de activar *Comp* y *miR-140* (Fig. 9).

1.1.2 Análisis de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión endógena de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140*, *S100A1* y *Agc1*.

Con la intención de confirmar los resultados obtenidos anteriormente, se realizó un estudio de la expresión endógena de los genes de interés en presencia o ausencia de SHOX; SHOX2; o sus mutantes, p.L132V y p.L155V respectivamente, que impiden que la proteínas lleve a cabo su función (Aza-Carmona et al. 2011; 2014). Se midieron los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa, utilizando ARN extraído de células mesenquimales de ratón, C3H/10T1/2. Los resultados indicaron que *Matn1* y *Comp* muestran una diferencia significativa en su expresión en presencia de SHOX. En el caso de *Matn1*

se observó un nivel de expresión tres veces superior al de las células control. Sin embargo, ni el mutante de SHOX, p.L132V, ni SHOX2 silvestre o el mutante de SHOX2, p.L155V, son capaces de activar la expresión de *Matn1* (Fig. 10A). En el caso de *Comp*, tanto SHOX silvestre, como con la mutación p.L132V activan su expresión, pero no SHOX2 silvestre ni su mutante (Fig. 10B). El resto de genes analizados: *Col2a1*, *miR-140*, *S100a1* y *Agc1* no muestran diferencia alguna en su expresión, tanto en presencia de SHOX, como de SHOX2 (Fig. 10). La correcta sobreexpresión de SHOX, SHOX2 y sus mutantes fue confirmada mediante la misma técnica (Fig. 11, Anexo I).

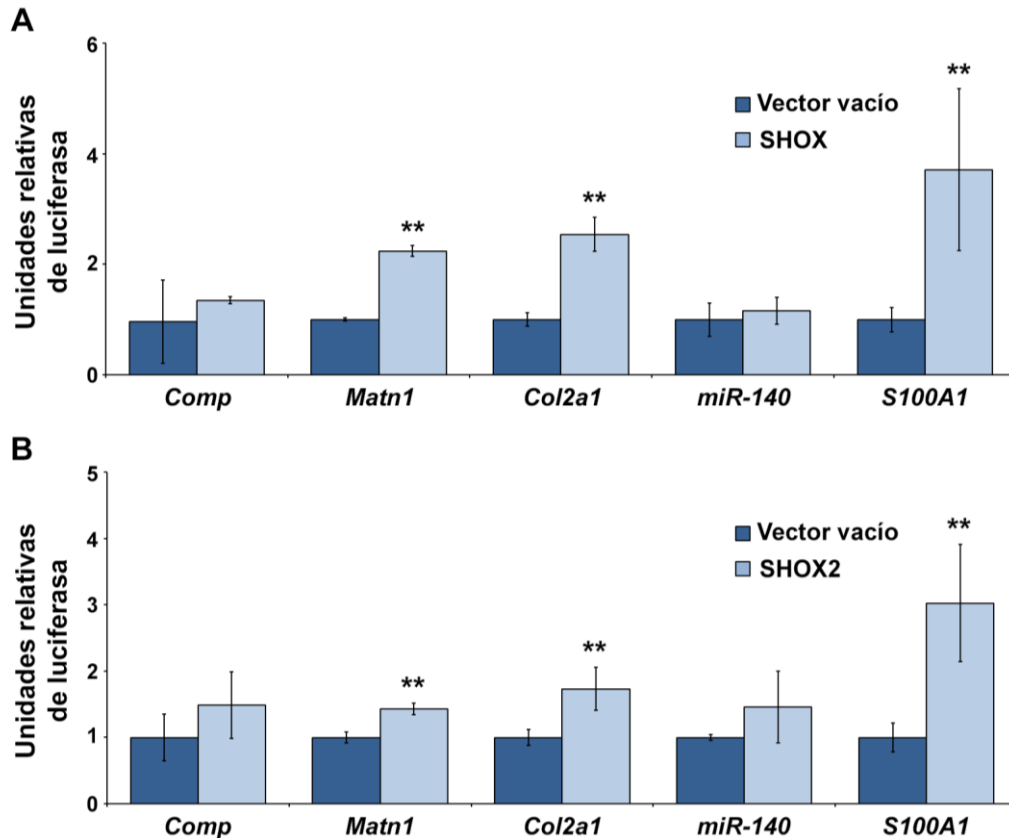


Figura 9. Estudio de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1*. Análisis de la activación de los promotores de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1* en presencia de SHOX (A) o SHOX2 (B) mediante ensayo de luciferasa en células U2OS. Se utilizaron vectores pGL3Basic en los que el gen reportero de la luciferasa se encuentra bajo el control de las diferentes regiones reguladoras de los genes de interés. Al mismo tiempo, se transfeció con vectores de expresión pcDNA3.1 de SHOX o SHOX2 y con el vector de luciferasa pRL-SV40, que contiene el promotor del virus SV40, como control de transfección. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas y se muestran en unidades relativas de luciferasa, que se obtienen al llevar a cabo una doble normalización de los valores crudos, contra el control de transfección y contra las células transfectadas únicamente con el vector de expresión vacío (pcDNA3.1). Los dos asteriscos indican los valores con diferencias significativas con respecto a las células transfectadas con el vector vacío ($p < 0.01$). SHOX y SHOX2 activan la expresión de *Matn1*, *Col2a1* y *S100A1* de forma directa.

1.2 Caracterización del papel de Shox2 en la regulación de la expresión de *Comp*, *Matn1*, *miR-140*, *S100a1* y *Agc1*, *in vivo*.

Cabe destacar que *SHOX* no tiene homólogo en ratón por lo tanto solo se ha podido caracterizar el papel de *Shox2* *in vivo*. Estudios previos demostraron que *Shox2* regula la expresión de varias proteínas características de la MEC de cartílago *in vivo*, entre ellas *Col2a1* y *Agc1* (Bobick et al. 2012). Para ello utilizaron cultivos de micromasa de células obtenidas de los miembros en desarrollo de dos ratones *knock-out* condicionales de *Shox2*: *Col2a1-Cre(Shox2)*, que knockea *Shox2* exclusivamente en cartílago (Bobick et al. 2012), y *Prrx1-Cre(Shox2)*, que lo deleciona en toda la extremidad (Logan et al. 2002).

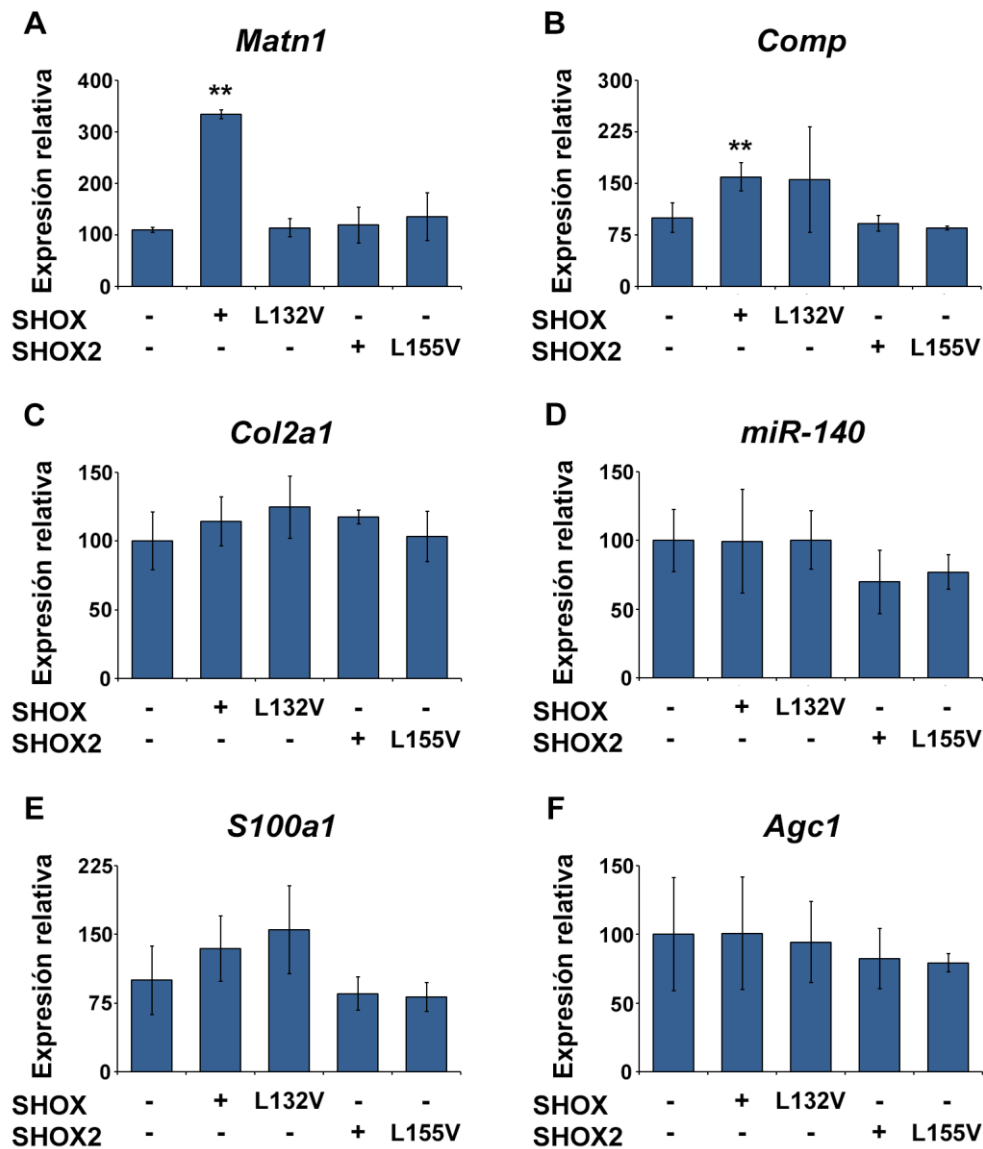


Figura 10. Análisis de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión endógena de *Matn1*, *Comp*, *Col2a1*, *miR-140*, *S100a1* y *Agc1*. Comparación, mediante PCR cuantitativa, de los niveles de expresión de los genes *Matn1* (A), *Comp* (B), *Col2a1* (C), *miR-140* (D), *S100a1* (E) y *Agc1* (F) entre células C3H10T1/2 de ratón transfectadas con el vector de expresión (pcDNA3.1) de SHOX; de SHOX2; de sus mutantes, p.L132V y p.L155V respectivamente; o el vector vacío. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. Los resultados que muestran diferencias significativas con respecto al vector vacío aparecen marcados con dos asteriscos ($p < 0.01$). SHOX activa la expresión endógena de *Matn1*.

1.2.1 Análisis de la expresión de *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100a1* en cultivos de micromasa con células de extremidades en desarrollo de ratón.

Con el fin de analizar si los genes *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100a1* también están regulados por *Shox2* a través de *Bmp*, se estudió su expresión en cultivos de micromasa de miembros en desarrollo de ratones *knock-out Col2a1-Cre(Shox2)* y *Prrx1-Cre(Shox2)* y ratones control de la misma camada, es decir que expresan *Shox2* (E12.5 (días post coito)). Se observó que *Comp* y *miR-140* muestran un aumento de la expresión en ratones *Col2a1-Cre(Shox2)* (Fig. 12A) y disminución en *Prrx1-Cre(Shox2)* respecto a los ratones control (Fig. 12B), al igual que lo descrito previamente para *Col2a1* y *Agc1* (Bobick et al. 2012). Por otro lado, *Matn1* no muestra diferencias significativas (Fig. 12). *S100a1* presentó unos niveles de expresión muy bajos, lo que imposibilitó su estudio.

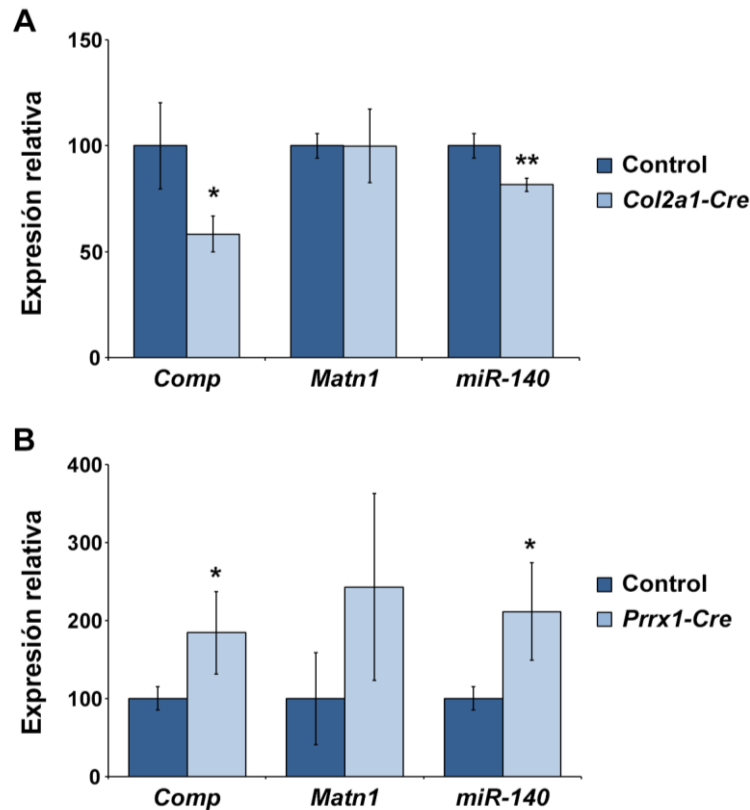


Figura 12. Análisis de las diferencias de expresión de *Comp*, *Matn1* y *miR-140* en ratones *knock-out* para *Shox2*. Comparación mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión de los genes *Comp*, *Matn1* y *miR-140* en cultivos de micromasa de miembros en desarrollo de ratones *knock-out* de *Shox2* (E12.5). Se buscaron diferencias de expresión entre los ratones mutantes para *Shox2*: *Prrx1-Cre* (A) o *Col2a1-Cre* (B) y controles de la misma camada. Los valores de expresión relativa se obtuvieron mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de las tres réplicas biológicas realizadas. Los resultados que muestran diferencias significativas con respecto al control aparecen marcados con asteriscos (* para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$). La expresión de *Comp* y *miR-140* aumenta en los miembros de ratones *Prrx1-Cre* y disminuye en los de ratones *Col2a1-Cre*.

1.2.2 Estudio del patrón de expresión de *Comp*, *Matn1* y *Agc1*, en extremidades en desarrollo de ratones *knock-out* de *Shox2*.

Se analizó el patrón de expresión de *Comp*, *Matn1* y *Agc1* en cortes de miembros superiores de ratón, concretamente húmeros, en distintas etapas de desarrollo, E13.5 y E14.5, mediante hibridación *in situ*. Se utilizaron ratones silvestre y los dos modelos *knock-out* descritos anteriormente: *Col2a1-Cre(Shox2)* y *Prrx1-Cre(Shox2)*.

Los resultados muestran que, tanto en el ratón silvestre E13.5, como en el E14.5, *Comp* se expresa en el centro de la diáfisis del húmero, donde se localizan los condrocitos prehipertróficos, y en el periostio (Fig. 13A). *Matn1* y *Agc1* se expresan de forma homogénea por todo el húmero tanto en E13.5 como en E14.5 (Fig. 13A). Se comparó el patrón de expresión del ratón silvestre y el ratón *Col2a1-Cre(Shox2)* y se observó que no presentan diferencias en la expresión de *Comp*, *Matn1* y *Agc1* en E13.5 ni en E14.5 (Fig. 13A). También se analizó el patrón de expresión del ratón *Prrx1-Cre(Shox2)* con respecto al silvestre. Se observó que *Comp* se expresa exclusivamente en el periostio del húmero en formación en el ratón *Prrx1-Cre(Shox2)* y está ausente en los condrocitos hipertróficos, tanto en E13.5, como en E14.5 (Fig. 13). *Matn1* y *Agc1* muestran una expresión uniforme a lo largo de todo el húmero y no presentan diferencias de expresión entre el ratón *Prrx1-Cre(Shox2)* y el silvestre en ninguna de las etapas de desarrollo estudiadas (Fig. 13B).

1.3 Análisis del papel de SHOX y SHOX2 en la regulación de la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1* a través del trío SOX (forma indirecta).

Previamente se demostró que SHOX y SHOX2 interaccionan con SOX5 y SOX6, que junto a SOX9 forman el trío SOX, y como consecuencia de dicha interacción son capaces de activar la expresión de *Agc1* (Aza-Carmona et al., 2011; 2014). El trío SOX también regula la expresión de otros genes relacionados con la MEC de cartílago, como son *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1*, por lo tanto, es posible que SHOX y SHOX2 sean capaces de regular su expresión a través del trío SOX.

1.3.1 Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1* a través del trío SOX.

Se llevó a cabo un ensayo de luciferasa en células U2OS, en el que se analizaron los cambios en la activación de los genes de interés, en células que sobreexpresan distintas combinaciones de SOX6; SOX9; SHOX o sus mutantes, p.L132V, p.R153L, p.A170P y p.R280P. Los mutantes de SHOX p.L132V, p.R153L y p.A170P afectan al homodominio, y han sido encontrados en pacientes con DLW (Grigellione et al. 2000 y Shears et al. 2002), el mutante p.R280P afecta al dominio de transactivación, OAR, y no ha sido descrito en ningún paciente, pero afecta a un aminoácido altamente conservado. Posteriormente a su diseño, se encontró un cambio que afecta al mismo aminoácido, p.R280L, en un paciente con TBI (Hirschfeldova et al. 2012) (Tabla 10). Se ha demostrado que SOX5 y SOX6 tienen un papel redundante, por lo tanto, en nuestros experimentos solo se utilizó SOX6 (Smits et al. 2001 y Aza-Carmona et al. 2011; 2014).

Mutante de SHOX	Dominio afectado	Localización nuclear	Unión a SOX6 (%)	Homodim. (%)	Unión a ADN	% de activación de <i>Agc1</i>
(1) p.L132V	HD	+	0%	20%	+/-	20%
(2) p.R153L	HD	+	100%	40%	++	100%
(3) p.A170P	HD*	-	0%	0%	-	ND
(4) p.R280P*	OAR	+	ND	15%	ND	100%

Tabla 10. Resumen de las características de los mutantes de SHOX utilizados en los ensayos de luciferasa.

* La mutación A170P también afecta a la señal de localización nuclear, impidiendo la correcta exportación de SHOX al núcleo (Sabherwal et al. 2004). Los símbolos indican una activación o unión: ausente (-), débil (+/-), moderada (+) y fuerte (++). ND: no determinado. Homodim.: Homodimerización. HD: Homeodominio. OAR: dominio de transactivación. Los porcentajes de unión a SOX6, homodimerización y activación de *Agc1*, se dan respecto a los obtenidos con SHOX silvestre (100%) (Grigellione et al. 2000, Shears et al. 2002 y Aza-Carmona et al. 2011).

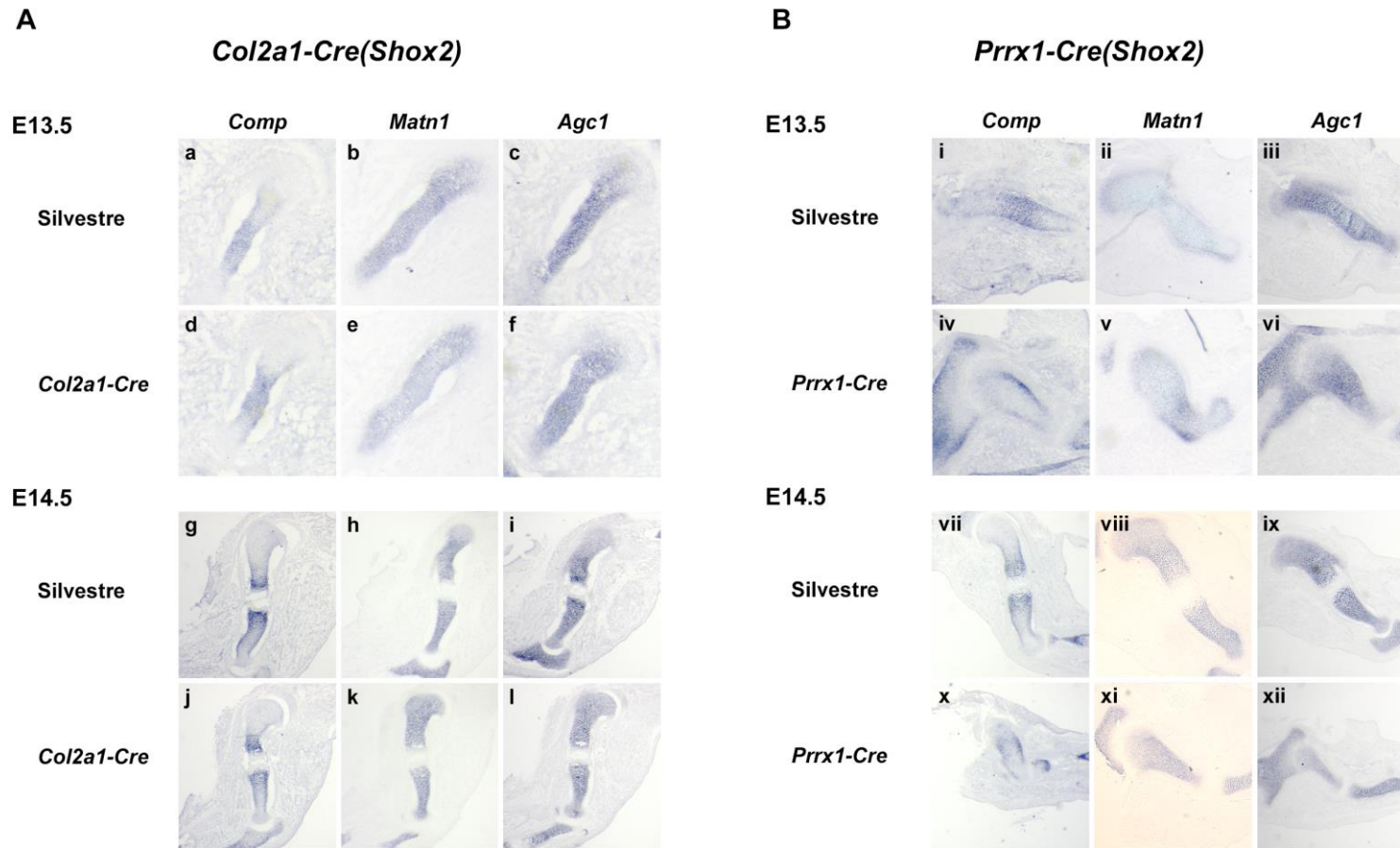


Figura 13. Estudio del patrón de expresión de *Comp*, *Matn1* y *Agc1*, en miembros en desarrollo de embriones de ratón. Se utilizaron dos ratones *knock-out*: *Col2a1-Cre(Shox2)* (A) y *Prrx1-Cre(Shox2)* (B). Se analizaron las diferencias en el patrón de expresión de *Comp*, *Matn1* y *Agc1* entre los miembros en desarrollo (húmero), de ratones sin *Shox2* y ratones silvestres. Se utilizó la técnica de hibridación *in situ* y se estudiaron fetos de dos etapas diferentes de desarrollo, E13.5 (a-f e i-vi) y E14.5 (g-l y vii-xii). El gen *Comp* muestra un patrón de expresión diferente al normal en miembros en desarrollo de embriones de ratón *Prrx1-Cre(Shox2)*.

Se observó que SOX9 activa la expresión de *Comp* y *S100A1* y que esta activación se incrementa de forma moderada al sobreexpresar también SOX6, y en gran medida al sobreexpresar SOX9, SOX6 y SHOX juntos. Este gran aumento no se observó con los tres de los mutantes de SHOX localizados en el homedominio: p.L132V (1), p.R153L (2), p.A170P (3) pero sí con el mutante del OAR, p.R280P (4) (Fig. 14A y 14B). En el caso de *Matn1* ocurre algo parecido, SOX9 aumenta la activación, y SOX6 junto con SHOX hacen que esa activación se incremente. Sin embargo, todos los mutantes de SHOX provocan una reducción en su activación (Fig. 14C). Por otro lado, *Col2a1* se activa en presencia del trío SOX, pero la presencia de SHOX no provoca un incremento significativo de esa activación (Fig. 14D). En cuanto a *miR-140*, SOX9 no es capaz de activar la expresión por sí solo, pero sí junto a SOX6, esta activación se ve aumentada al sobreexpresar SHOX silvestre y SHOX con las mutaciones p.R153L (2) y p.R280P (4), pero no con p.L132V (1) y p.A170P (2) (Fig. 14E).

Se obtuvieron resultados idénticos al sobreexpresar SHOX2 y sus mutantes, en lugar de SHOX. Se utilizaron dos mutantes de SHOX2: p.L155V, localizado en el homedominio, y p.Q234X, en el que el dominio OAR está totalmente ausente (Fig.15).

1.3.2 Análisis de la capacidad de SHOX de regular la expresión endógena de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140*, *S100A1* y *Agc1*, a través del trío SOX.

Para confirmar los resultados obtenidos mediante luciferasa, se llevó a cabo un análisis de la expresión endógena de los genes de interés en presencia de distintas combinaciones de SOX6, SOX9, SHOX y el mutante de SHOX, p.L132V. Se utilizó la técnica de PCR cuantitativa con ARN extraído de células mesenquimales C3H/10T1/2. Los resultados demuestran que la expresión de *Matn1* aumenta unas 16 veces en presencia del trío SOX y que esta activación aumenta el doble al sobreexpresar también SHOX silvestre, pero no con la mutación p.L132V (Fig. 16A). El resto de genes analizados, *Comp*, *Col2a1*, *miR-140*, *S100a1* y *Agc1* no muestran diferencias significativas (Fig. 16). Se confirmó la sobreexpresión de *SHOX*, *SOX6* y *SOX9* mediante la misma técnica (Fig. 17; Anexo I).

1.4 Análisis del papel de SHOX en la regulación de la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1* a través de BMP.

Estudios previos en ratón demostraron que *Shox2* es capaz de regular la expresión de *Col2a1* y *Agc1* a través de *Bmp2* y *Bmp4* (Bobick et al. 2012). Nos planteamos la posibilidad de que *Bmp2* y *Bmp4* también estén implicadas en la regulación de la expresión de *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100A1*.

1.4.1 Estudio de la capacidad de BMP2 de regular la expresión de *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100A1*.

Se analizó la expresión de dichos genes en presencia de BMP2 o de Nog (Noggin), su agonista, que bloquea su inducción, durante diferentes periodos de tiempo de incubación: 24, 48, 72 y 96 horas. El estudio se realizó en células C3H/10T1/2 indiferenciadas de ratón, que como respuesta a la estimulación por BMP2 comenzaron a diferenciarse en condrocitos. Se vio que *Col2a1*, *miR-140* y *Sox9* aumentan su expresión de forma gradual en el tiempo en presencia de BMP2, pero no de Nog (Fig. 18). Por otro lado,

S100a1 muestra un ligero aumento de la expresión a las 72 y 96 horas, tanto en presencia de BMP2 como de Nog (Fig. 18B). El resto de genes, *Comp*, *Matn1* y *Agc1*, y *Shox2*, no muestran respuesta alguna a la estimulación por parte de BMP2 o Nog (Fig. 18A).

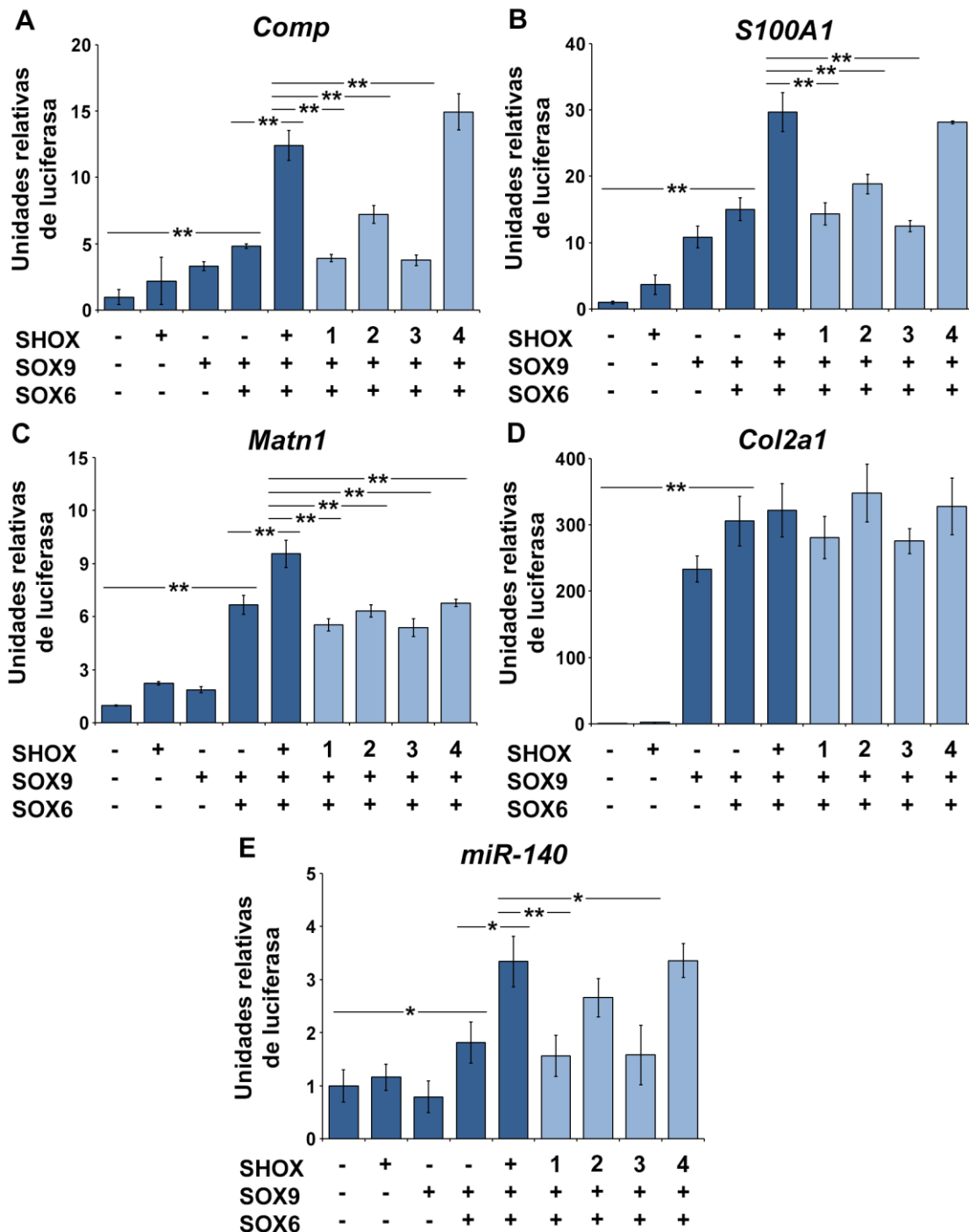


Figura 14. Caracterización del efecto de SHOX en la regulación de la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1*, llevada a cabo por el trío SOX. Análisis de los cambios en los niveles de expresión de *Comp* (A), *S100A1* (B), *Matn1* (C), *Col2a1* (D) y *miR-140* (E) mediante ensayo de luciferasa en células U2OS, que fueron transfectadas con distintas combinaciones de vectores de expresión (pcDNA3.1) de SOX6, SOX9 y SHOX o sus mutantes: p.L132V (1), p.R153L (2), p.A170P (3) y p.R280P (4). Además, se transfectó con el vector de luciferasa pRL-SV40 como control de transfección. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas y se muestran en unidades relativas de luciferasa. Los resultados que muestran diferencias significativas aparecen señalados con asteriscos (* para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$). SHOX regula la expresión de *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100A1* a través del trío SOX.

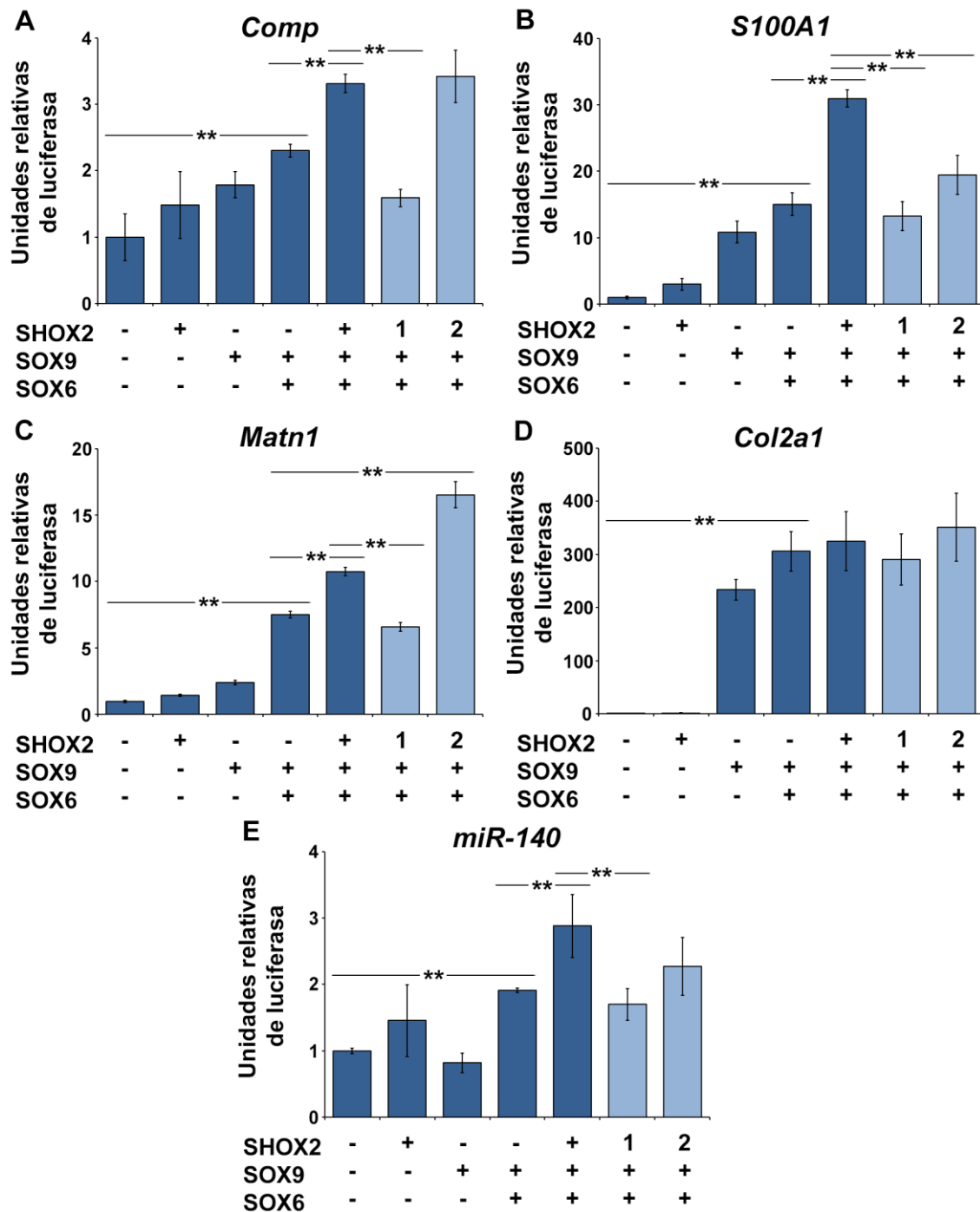


Figura 15. Caracterización del efecto de SHOX2 en la regulación de la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1*, llevada a cabo por el trío SOX. Análisis de los cambios en los niveles de expresión de *Comp* (A), *S100A1* (B), *Matn1* (C), *Col2a1* (D) y *miR-140* (E) mediante ensayo de luciferasa en células U2OS, que fueron transfectadas con distintas combinaciones de vectores de expresión (pcDNA3.1) de SOX6, SOX9, SHOX2 o sus mutantes: p.L155V (1) y p.Q234X (2). Además, se transfectó con el vector de luciferasa pRL-SV40 como control de transfección. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas y se muestran en unidades relativas de luciferasa. Los resultados que muestran diferencias significativas aparecen señalados con asteriscos (* para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$). SHOX2 regula la expresión de *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100a1* a través del trío SOX.

1.4.2 Estudio de la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *miR-140* y *S100A1*, a través de BMP.

Debido a la alta homología que existe entre SHOX y SHOX2 y a que ambas podrían llevar a cabo las mismas funciones, es posible que SHOX también sea capaz de regular la expresión de los genes que codifican proteínas características de la MEC a través de Bmp2 o Bmp4. Con la intención de

comprobarlo, se analizaron los niveles de expresión de *Bmp2* y *Bmp4*, en células C3H/10T1/2 que sobreexpresan SHOX silvestre, o mutante (p.L132V) y SHOX2 silvestre o mutante (p.L155V). Se concluyó que la presencia de SHOX o SHOX2 no provoca ninguna variación en la expresión endógena de *Bmp2* (Fig. 19A), ni *Bmp4* (Fig. 19B).

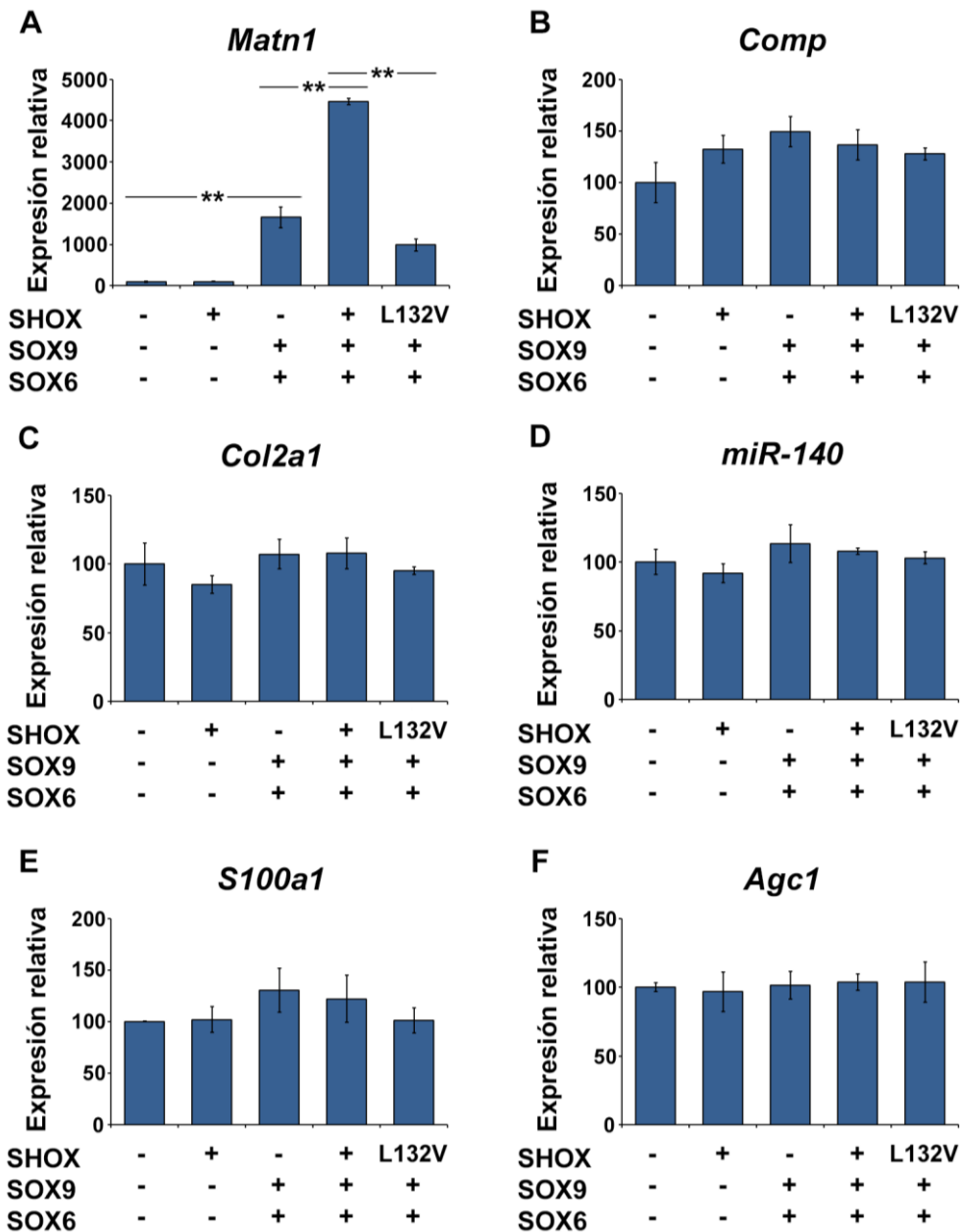


Figura 16. Análisis de la capacidad del SHOX de regular la expresión endógena de *Matn1*, *Comp*, *Col2a1*, *miR-140*, *S100a1* y *Agc1* a través del Trío SOX. Comparación, mediante PCR cuantitativa, de los niveles de expresión de los genes *Matn1* (A), *Comp* (B), *Col2a1* (C), *miR-140* (D), *S100a1* (E) y *Agc1* (F) entre células 10T1/2 de ratón transfectadas con distintas combinaciones de vectores de expresión (pcDNA3.1) de SOX6, SOX9, SHOX y su mutante p.L132V. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. Los resultados que muestran diferencias significativas aparecen marcados con dos asteriscos ($p < 0.01$). El trío SOX aumenta la expresión endógena de *Matn1* llevada a cabo por SHOX.

El trío SOX puede ser necesario para que SHOX lleve a cabo su regulación a través de BMP. Para demostrarlo se llevó a cabo un análisis de los cambios en la expresión de *Bmp2* y *Bmp4* en células C3H/10T1/2, en presencia de distintas combinaciones de SOX6, SOX9, SHOX y su mutante, p.L132V. Se observó que la presencia tanto del trío SOX por sí solo, como junto a SHOX no afecta a la expresión de *Bmp2* (Fig. 20A) ni *Bmp4* (Fig. 20B).

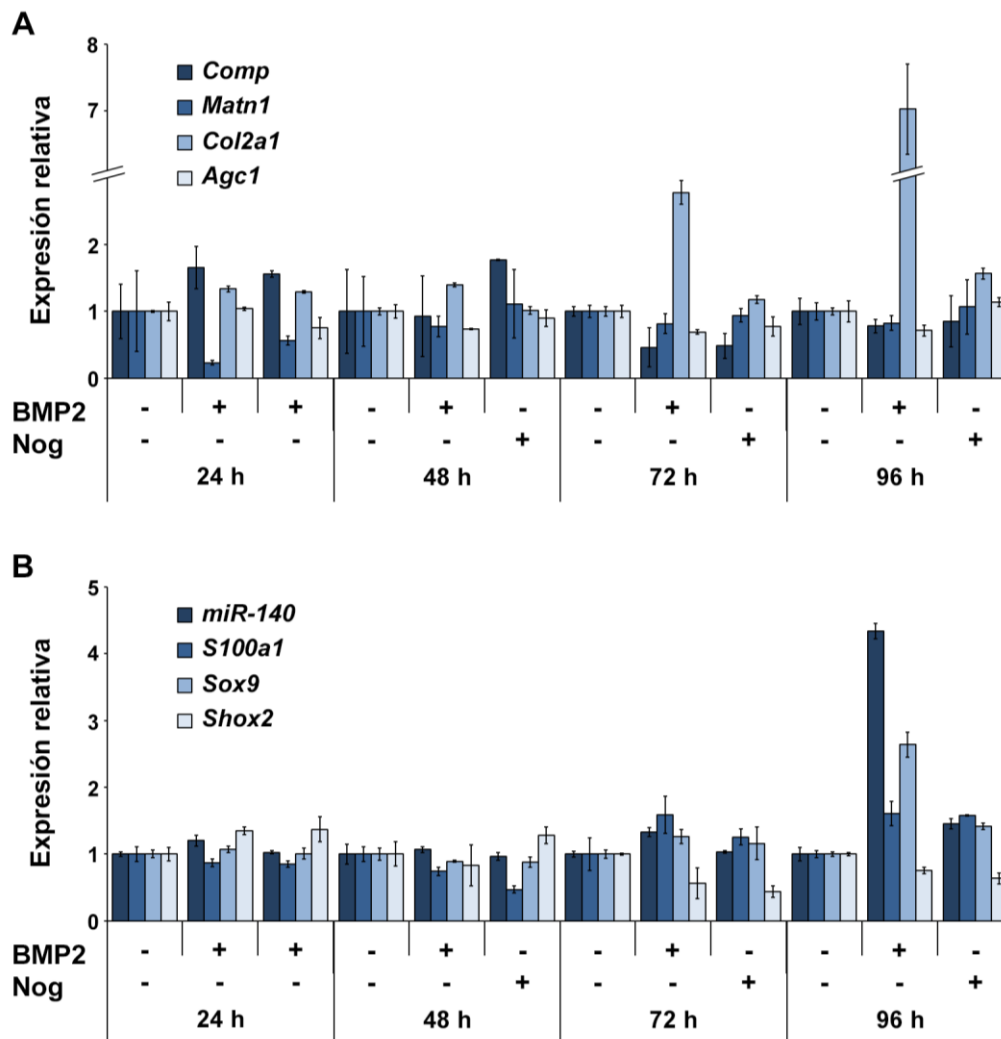


Figura 18. Determinación de la capacidad de BMP2 de regular la expresión de los genes estudiados. Análisis de los niveles de expresión de los genes *Comp*, *Matn1*, *Col2a1* y *Agc1* (A); y *miR-140*, *S100a1*, *Sox9* y *Shox2* (B); mediante PCR cuantitativa, en células 10T1/2 de ratón que han sido estimuladas con BMP2 durante diferentes periodos de tiempo: 24, 48, 72 y 96 horas. En cada periodo, se comparó la expresión de células sin ningún estímulo, estimuladas con BMP2 y que habían estado expuestas a BMP2 24 horas y posteriormente a su agonista, Noggin, hasta su lisis. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. BMP2 activa la expresión de *Col2a1*, *miR-140*, *S100a1* y *Sox9*.

1.5 Análisis de la capacidad de SHOX de regular la expresión durante la condrogénesis.

Existe la posibilidad de que SHOX necesite otros factores a parte del trío SOX para poder regular la expresión de los genes de la MEC de cartílago. Estos factores pueden ser exclusivos de las células condrogénicas o condrocitos, por lo tanto, no están presentes en otros tipos celulares, o en células indiferenciadas.

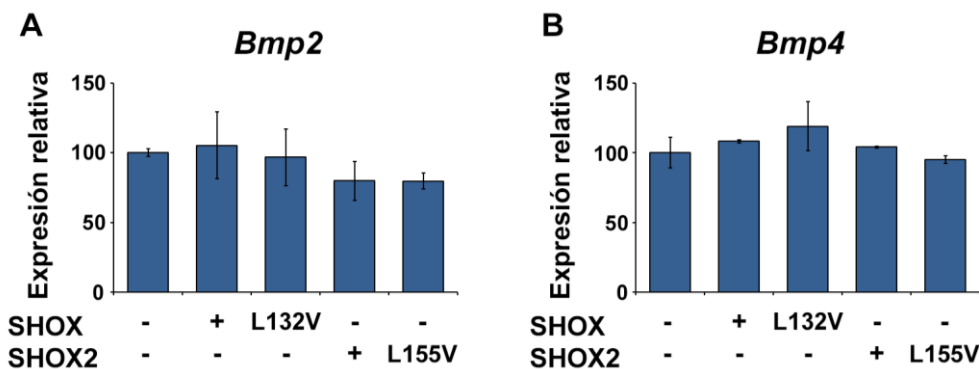


Figura 19. Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión endógena de *Bmp2* y *Bmp4*. Comparación, mediante PCR cuantitativa, de los niveles de expresión de los genes *Bmp2* (A) y *Bmp4* (B) en células 10T1/2 transfectadas con el vector de expresión (pcDNA3.1) de SHOX, SHOX2 o sus mutantes p.L132V y p.L155V respectivamente, y el vector pcDNA3.1 vacío. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. SHOX y SHOX2 no activan la expresión de *Bmp2* ni *Bmp4* en células mesenquimales.

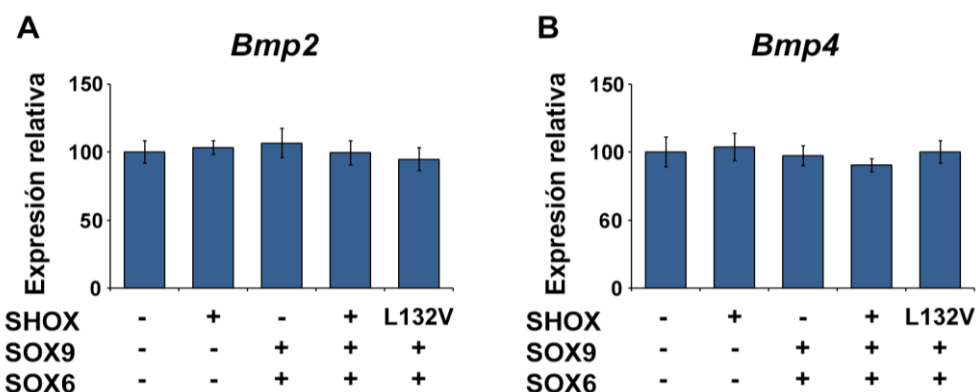


Figura 20. Análisis de la capacidad del trío SOX de regular la expresión endógena de *Bmp2* y *Bmp4*. Comparación, mediante PCR cuantitativa, de los niveles de expresión de los genes *Bmp2* (A) y *Bmp4* (B) en células 10T1/2 de ratón que sobreexpresan distintas combinaciones de SOX6, SOX9, SHOX y su mutante, p.L132V. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. El trío SOX no afecta a la expresión de *Bmp2* ni *Bmp4* en células mesenquimales.

1.5.1 Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *Agc1*, *miR-140* y *S100a1* durante la condrogénesis.

Se analizó la expresión de los genes citados en células mesenquimales indiferenciadas que fueron previamente estimuladas con BMP2 para inducir su condrogénesis (Lengner et al. 2004), o con Noggin, su agonista (Bobick et al. 2012). Se buscaron diferencias entre las células que fueron transfectadas con el vector de expresión de SHOX o con el mismo vector vacío y que habían sido estimuladas con BMP o Noggin durante 72 (Fig. 21A) o 96 horas (Fig. 21B). Los resultados demostraron que la presencia de SHOX en células que están diferenciándose a condrocitos produce una variación de la expresión de varios de los genes estudiados. Se observó que SHOX incrementa en dos veces la expresión de *Matn1* independientemente de BMP2 (Fig. 21A). Dicho aumento no se da cuando bloqueamos la acción de BMP2 sustituyéndolo por Noggin (Fig. 21A), ni tampoco a las 96 horas (Fig. 21B). Por otra parte, SHOX aumenta la expresión de *Comp*, pero únicamente a las 72 horas y en células que no han sido tratadas con BMP2 ni Noggin (Fig. 21). La expresión de *S100a1*, se ve aumentada en presencia de SHOX, pero sin BMP2 o Nog, a las 96 horas exclusivamente (Fig. 21B). El resto de genes no muestran variaciones en la expresión en presencia de SHOX (Fig. 21).

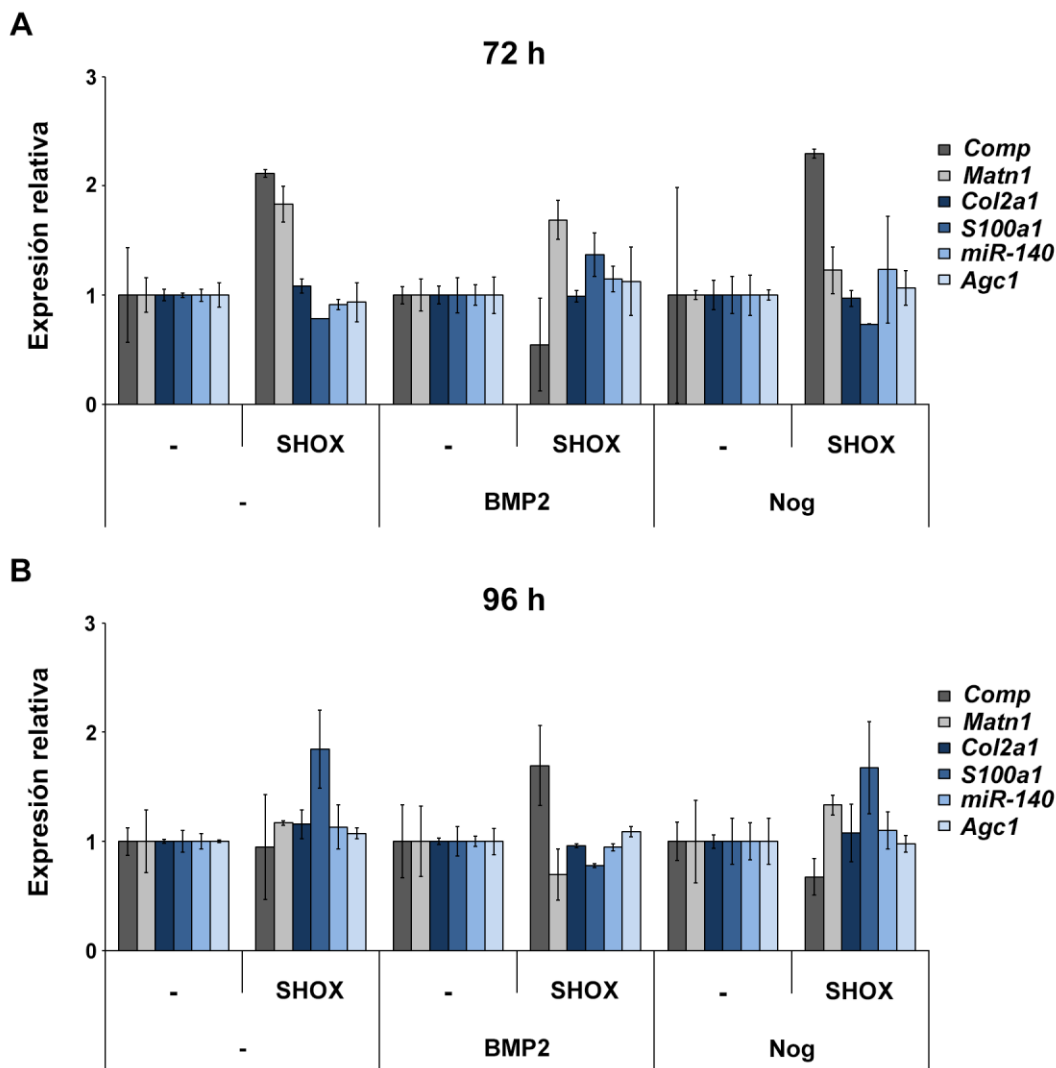


Figura 21. Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión endógena de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *S100a1*, *miR-140* y *Agc1*, durante la condrogénesis. Análisis de los niveles de expresión de los genes citados en células 10T1/2 mesenquimales de ratón que han sido estimuladas con BMP2, que induce la condrogénesis, durante 72 (A) y 96 horas (B). En cada periodo, se comparó la expresión de células transfectadas con SHOX o el vector vacío (sin SHOX, pcDNA3.1), que habían sido estimuladas con BMP2 o su agonista, Nog (Noggin), hasta su lisis. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. La presencia de SHOX no varía la expresión endógena de *Comp*, *Matn1*, *Col2a1*, *S100a1*, *miR-140* y *Agc1* en células en condrogénesis.

1.5.2 Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión de *Bmp2* y *Bmp4* durante la condrogénesis.

Puede ser que SHOX requiera otros factores exclusivos de los condrocitos, para poder regular la expresión de *Bmp2* y *Bmp4*. Para comprobarlo, se llevó a cabo un análisis de la expresión de *Bmp2* y *Bmp4* en células 10T1/2 transfectadas con el vector de expresión de SHOX o con el vector vacío, que fueron estimuladas con BMP2 o con Noggin, durante 72 o 96 horas. Se observó que SHOX no es capaz de regular la expresión de *Bmp2* (Fig. 22A) ni *Bmp4* (Fig. 22B), en las células que están diferenciándose en condrocitos.

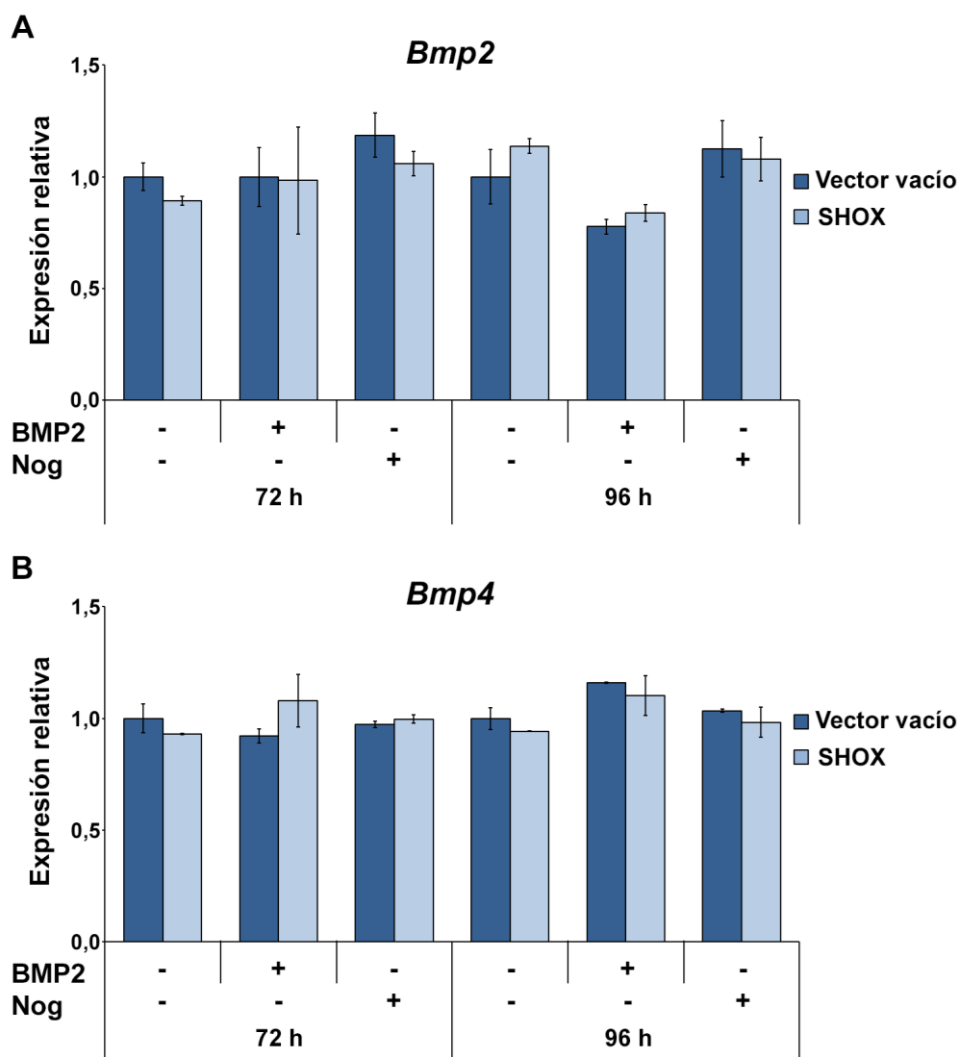


Figura 22. Estudio de la capacidad de SHOX de regular la expresión endógena de *Bmp2* y *Bmp4*, durante la condrogénesis. Análisis de los niveles de expresión de *Bmp2* (A) y *Bmp4* (B) en células 10T1/2 mesenquimales de ratón que han sido estimuladas con BMP2, durante 72 y 96 horas. En cada periodo, se comparó la expresión de células transfectadas con SHOX o el vector vacío (pcDNA3.1), que habían sido estimuladas con BMP2 o su agonista, Nog (Noggin), hasta su lisis. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. La presencia de SHOX no varía la expresión endógena de *Bmp2* ni *Bmp4* en células en condrogénesis.

1.6 Profundización en el estudio del papel de SHOX en la regulación de la expresión de *Matn1*.

Se realizaron una serie de experimentos el objetivo de confirmar y caracterizar la capacidad de SHOX de regular la expresión de *Matn1*.

1.6.1 Confirmación de la capacidad de SHOX de regular la expresión de *Matn1* de forma directa.

Se llevó a cabo un ensayo de luciferasa en células U2OS y se compararon los niveles de activación del promotor de *Matn1* silvestre, el promotor con las mutaciones *Pe1M1* e *IneM2* por separado, o el doble mutante (*Pe1M1* + *IneM2*), en presencia de SHOX. Ambos mutantes afectan a distintos sitios de unión de SOX9 y, por tanto, del trío SOX, impidiendo que lleve a cabo su regulación (Rentsendorj et al. 2005) (Fig. 23A y 23B). Se observó que SHOX es capaz de activar tanto el promotor silvestre, como los que presentan el cambio *Pe1M1* o *IneM2*, o el doble mutante (Fig. 23C).

Además, se analizó el efecto de las mutaciones *Pe1M1* e *IneM2* en la activación llevada a cabo por SHOX junto al trío SOX. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de luciferasa en células U2OS que

sobreexpresaban distintas combinaciones de las proteínas SOX6, SOX9 y SHOX, con el promotor de *Matn1* silvestre o con las variantes *Pe1M1* e *IneM2*. Se observó que la presencia de la mutación *Pe1M1* provoca una reducción de la activación por parte, tanto del trío SOX por sí solo, como del trío SOX junto con SHOX. Esta reducción es aún mayor cuando el promotor de *Matn1* contiene las dos variantes al mismo tiempo, *Pe1M1* e *IneM2* (Fig. 23D). Curiosamente, el promotor con el cambio de *IneM2* exclusivamente, presenta unos niveles de activación mayores que el promotor silvestre (Fig. 23D).

1.6.2 Delimitación de la región de regulación de SHOX en el promotor de *Matn1*.

Una vez demostrada la regulación de *Matn1* por parte de SHOX de forma directa e indirecta, se intentó identificar las regiones del promotor de *Matn1* implicadas en dicha regulación. Se realizó una búsqueda de posibles sitios de unión de SHOX, es decir, secuencias palindrómicas como P3: 5'-TAATNNNATTA-3' a las que SHOX se une de forma preferente (Rao et al. 2001). Se encontraron dos sitios imperfectos: Un elemento P5 entre las bases -1033 y -1020 (5'-TAATNNNNNATGA-3') y un elemento P4 entre -918 y -906 (5'-TAATNNNNATTT-3'). Se realizó un ensayo de luciferasa en células U2OS, en el que se compararon los niveles de activación mediada por SHOX, de fragmentos de distinto tamaño del promotor de *Matn1*. Los resultados indican que todos los fragmentos, incluidos los que no contienen los posibles sitios de unión de SHOX P4 y P5, muestran activación en presencia de SHOX (Fig. 24). Por lo tanto, el fragmento menor del promotor de *Matn1*, de -478 a +54 pb, que contiene los sitios de unión del trío SOX *Pe1* e *Ine*, es el único necesario para que SHOX active la expresión de *Matn1*.

1.6.3 Análisis de la capacidad de SHOX de regular la expresión del promotor de *MATN1* humano.

Como los experimentos anteriores fueron realizados utilizando el promotor de *Matn1* de pollo, se analizó la capacidad de SHOX de activar el promotor de *MATN1* humano. Se llevó a cabo un ensayo de luciferasa en células U2OS en las que el gen reportero de la luciferasa se encontraba bajo el control del promotor de *MATN1*. Las células fueron transfectadas con distintas combinaciones de vectores de expresión de SOX6; SOX9 y SHOX o los mutantes de SHOX: p.L132V, p.R153L, p.A170P y p.R280P. Se concluyó que SHOX y SOX9 por sí solos activan ligeramente la expresión de *MATN1* y que SHOX junto al trío SOX provocan una activación mucho mayor, unas ocho veces más que los niveles basales. Esta activación se ve reducida cuando están presentes los mutantes de SHOX p.L132V, p.R153L y p.A170P en lugar de SHOX silvestre, pero no con el mutante p.R280P (Fig. 25).

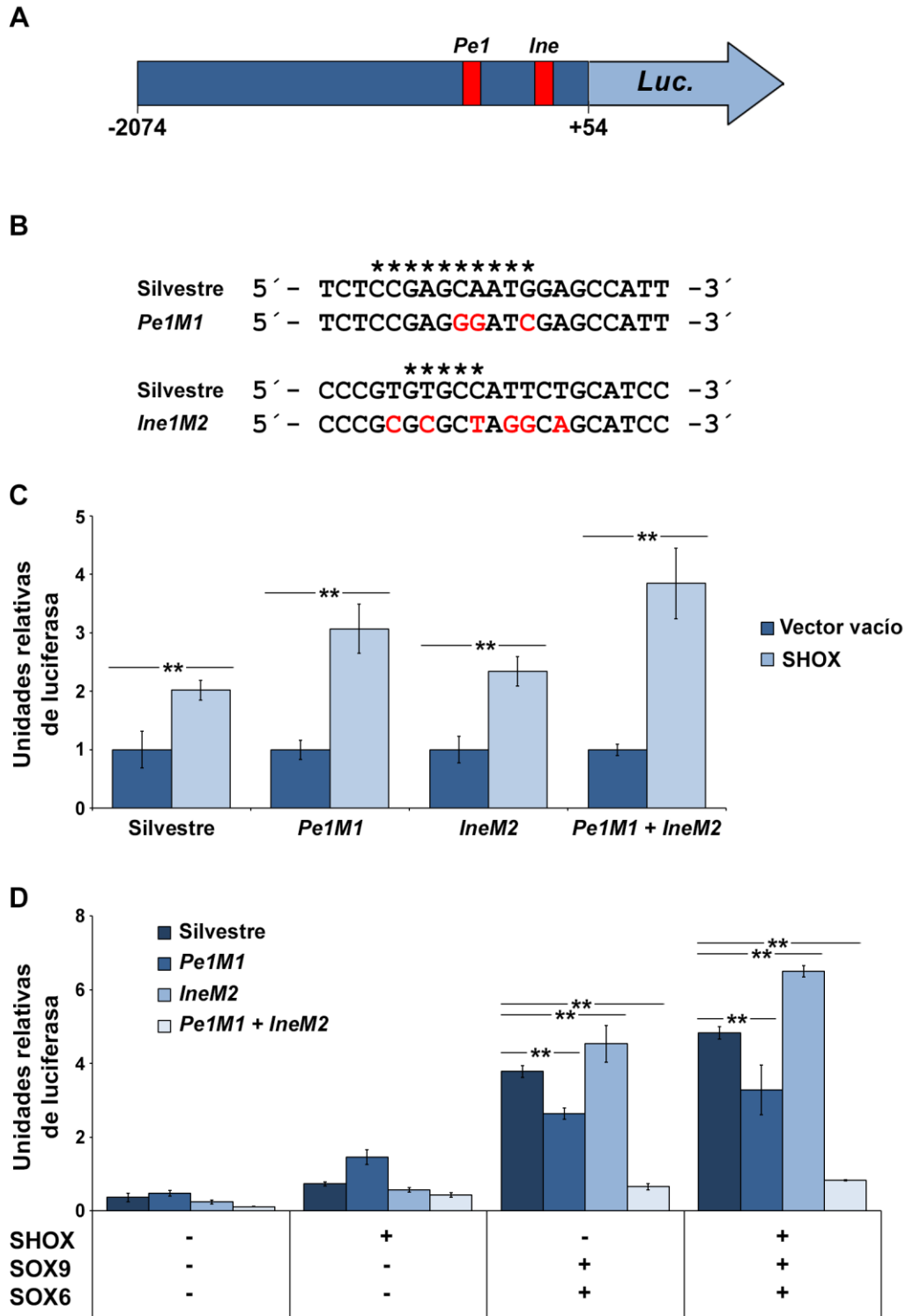


Figura 23. Confirmación de la capacidad de SHOX de activar el promotor de *Matn1* de forma directa. (A) Esquema del vector utilizado en el ensayo de luciferasa que incluye el promotor de *Matn1*, con las regiones *Pe1* e *Ine*. (B) Secuencia consenso del promotor de *Matn1* y sus mutantes, *Pe1M1* e *IneM2*. Los nucleótidos que varían en cada mutante aparecen marcados en rojo y los sitios de unión de Sox9 marcados con asteriscos. (C) Análisis de la capacidad de SHOX de activar el promotor de *Matn1* silvestre, *Pe1M1* o *IneM2* mediante ensayo de luciferasa. (D) Estudio de las diferencias en la activación entre el promotor de *Matn1* silvestre o con los cambios estudiados en presencia de distintas combinaciones de SHOX, SOX6 y SOX9, mediante ensayo de luciferasa en células U2OS. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas y se muestran en unidades relativas de luciferasa. Los valores que muestran diferencias significativas entre mutantes y el silvestre aparecen señalados con dos asteriscos ($p < 0.01$). Las mutaciones de *Pe1M1* e *IneM2* afectan a la activación llevada a cabo por el Trío SOX, pero no la activación directa de SHOX.

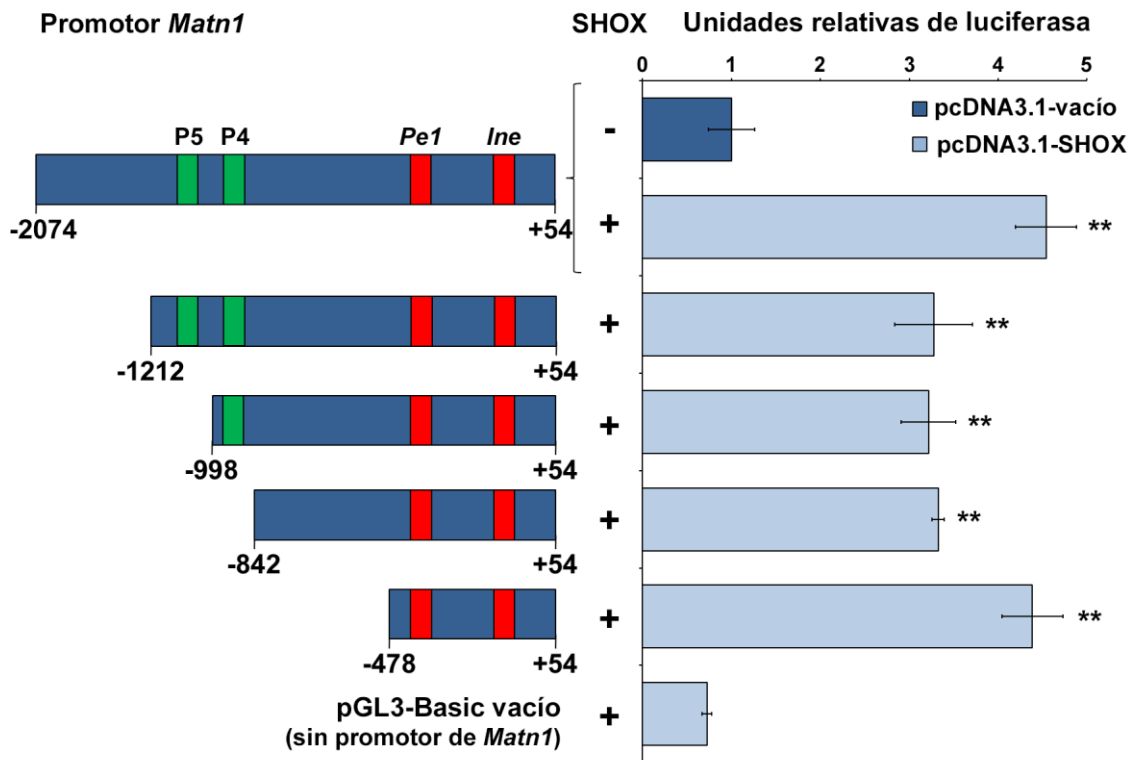


Figura 24. Análisis de las regiones necesarias para la activación llevada por parte de SHOX del promotor de *Matn1* dependiente de SHOX. Se llevó a cabo un ensayo de luciferasa en células U2OS de las regiones clave para la regulación del promotor de *Matn1* llevada a cabo por SHOX. Se compararon las diferencias de activación entre células transfectadas con el vector de expresión de SHOX o el vector vacío (pcDNA3.1), en células con el gen reportero de luciferasa bajo el control de fragmentos de distinto tamaño del promotor de *Matn1*. Se usó el vector pSV40 como control de transfección. En verde se muestran los posibles sitios de unión de SHOX y en rojo los descritos para el trío SOX (Nagy et al. 2011). Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas y se muestran en unidades relativas de luciferasa. Los resultados que muestran diferencias significativas con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (pcDNA3.1) aparecen marcados con dos asteriscos ($p < 0.01$). La región entre -478 y +54 pb es necesaria para que SHOX active el promotor de *Matn1*.

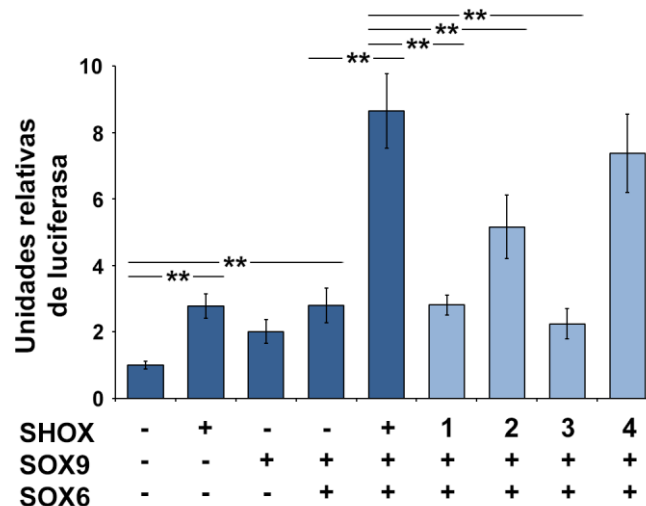


Figura 25. Análisis de la capacidad de SHOX de regular la expresión del promotor de *MATN1* humano. Análisis de los cambios de los niveles de expresión de *MATN1* mediante ensayo de luciferasa en células U2OS, que fueron transfectadas con distintas combinaciones de vectores de expresión de SOX6; SOX9 y SHOX o sus mutantes: p.L132V (1), p.R153L (2), p.A170P (3) y p.R280P (4). Además, se transfectó con el vector pSV40 como control de transfección. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas y se muestran en unidades relativas de luciferasa. Los resultados que muestran diferencias significativas aparecen señalados con dos asteriscos ($p < 0.01$). SHOX regula la expresión de *MATN1* de forma directa y a través del trío SOX.

1.7 Búsqueda de defectos en el promotor de *MATN1* en una cohorte de pacientes con DLW.

Defectos en el promotor de *MATN1* podrían provocar cambios en la regulación de la expresión llevada a cabo por *SHOX*, y por tanto, influir en el fenotipo presentado por pacientes con sospecha de DLW o TBI sin defectos en *SHOX*. Se buscaron alteraciones en el promotor de *MATN1*, en la región equivalente a la de -478 a +54 pb del promotor de *Matn1* de pollo, en una cohorte de 242 pacientes con sospecha de DLW y 95 con TBI, ambos sin defectos en *SHOX*/PAR1.

Se encontró un cambio, c.-199C>T, en heterocigosis (Fig. 26), que se localiza entre las regiones de interacción del trío *SOX*, *Pe1* e *Ine*. El cambio fue encontrado en una paciente española, de 19 años de edad, que fue clasificada como posible DLW. La paciente presenta talla baja (-2,5 DE) y extremidades proporcionadas, con valores de E/T (1,00) y TS/T (0,53) normales. Presenta incurvación del cúbito y el radio, con triangulación epifisaria. Se analizó a sus familiares y se observó que la madre presenta también el cambio. Aunque la madre y el padre presentan talla baja, la madre tiene además antecedentes familiares de talla baja (Fig. 26). El cambio no ha sido descrito previamente y su presencia ha sido descartada en 264 individuos con talla normal de origen español y en la base de datos 1000genomas.

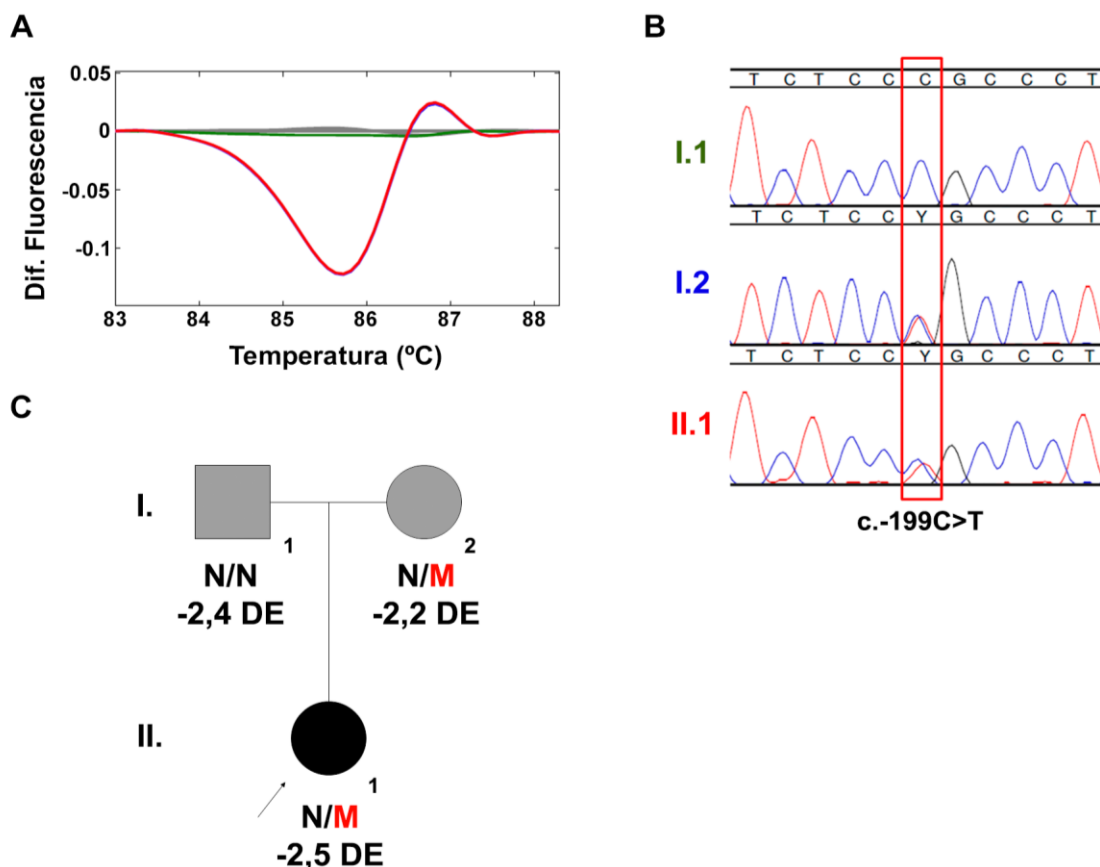


Figura 26. Análisis de la variante c.-199C>T del promotor de *MATN1*. (A) Curvas de fusión obtenidas por HRM del índice, II.1 (rojo), sus familiares, I.1 y I.2 (verde para el padre y azul para la madre) y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido de la secuenciación del promotor de *MATN1* del índice con el cambio c.-199C>T y sus familiares. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El color gris indica TBI y el negro fenotipo similar a DLW. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. El índice y su madre presentan la variante c.-199C>T.

1.7.1 Análisis funcional del cambio c.-199C>T, encontrado en el promotor de *MATN1*.

Se intentó demostrar la patogenicidad del cambio c.-199C>T, encontrado en el promotor de *MATN1*. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de luciferasa en células U2OS, en el que se compararon las

diferencias de activación entre el promotor de *MATN1* silvestre y con el cambio c.-199C>T, en presencia de SHOX y el trío SOX. Se concluyó que, ni la activación por parte de SHOX o SOX9 individualmente, ni la de SOX6 junto con SOX9 (trío SOX) se ven afectadas por el cambio c.-199C>T. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la activación del promotor mutado cuando las células sobreexpresan SHOX y el trío SOX al mismo tiempo (Fig. 27A).

Para validar este resultado, se crearon dos mutantes adicionales, c.-199C>A y c.-198-196del, que afectan al mismo nucleótido que el cambio encontrado (Fig. 27B). Se analizó su actividad mediante el mismo ensayo, comparando las variaciones en la activación de cada promotor mutado con respecto al promotor silvestre, en presencia de distintas combinaciones de SHOX, SOX6 y SOX9. Se observó que las nuevas mutaciones producen el mismo efecto que c.-199C>T en presencia de SHOX y el trío SOX (Fig. 27C).

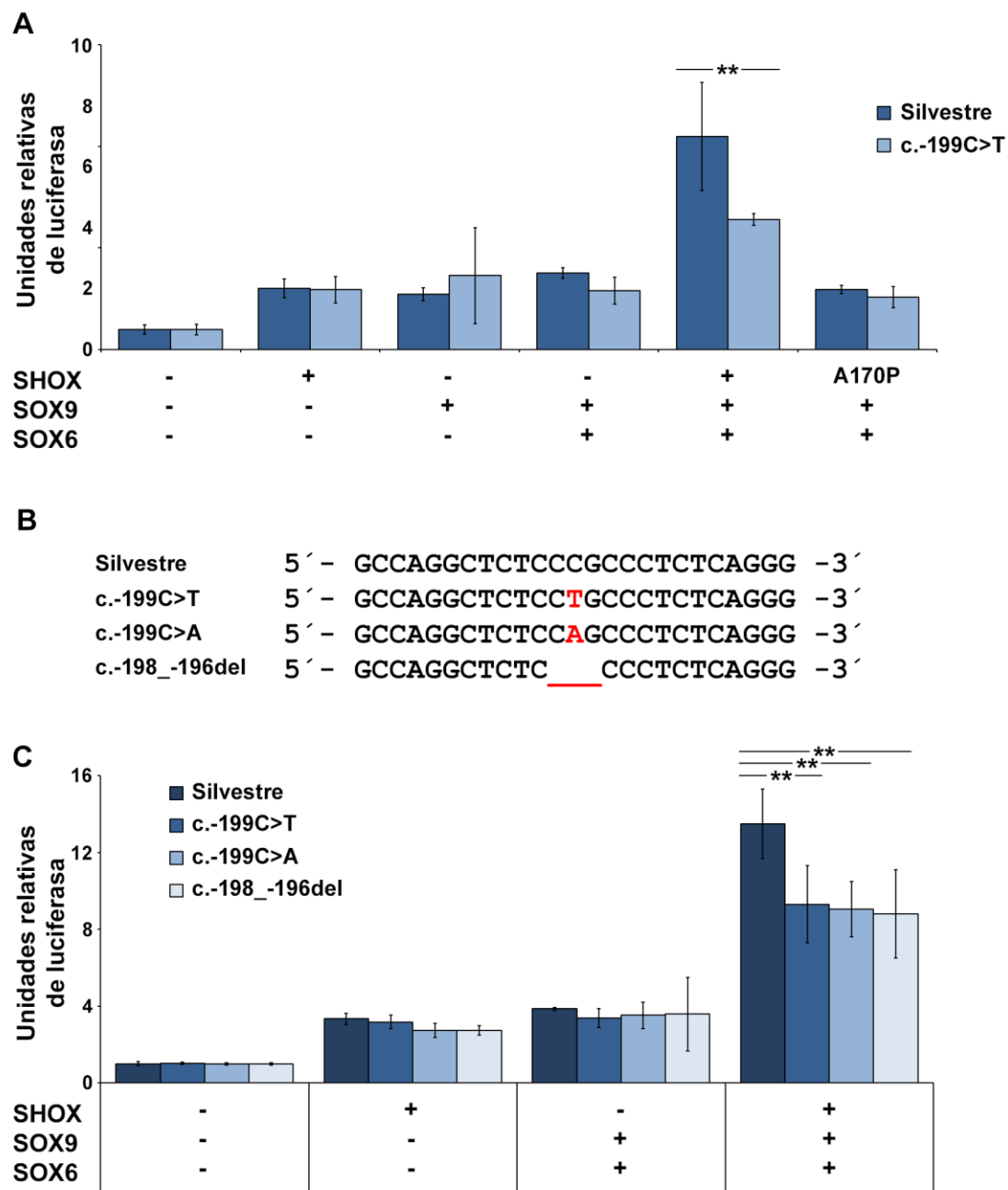


Figura 27. Análisis funcional del cambio del promotor de *MATN1* de c.-199C>T. (A) Estudio de las diferencias de regulación entre el promotor de *MATN1* silvestre y con el cambio c.-199C>T en presencia de distintas combinaciones de SHOX silvestre, SHOX con la mutación p.A170P, SOX6 y SOX9, mediante ensayo de luciferasa. (B) Secuencia consenso del promotor de *MATN1* silvestre, del cambio encontrado c.-199C>T y de las construcciones creadas para demostrar su patogenicidad. Los nucleótidos que varían en cada mutante aparecen marcados en rojo. (C) Estudio de las diferencias en la activación de *MATN1* entre el promotor de *MATN1* silvestre, con el cambio c.-199C>T, c.-199C>A y c.-198_-196del. Los cambios se analizaron en presencia de distintas combinaciones de SHOX, SOX6 y SOX9 mediante ensayo de luciferasa. Los ensayos se realizaron en células U2OS. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas y se muestran en unidades relativas de luciferasa. Los resultados que muestran diferencias significativas entre mutantes y el silvestre aparecen señalados con dos asteriscos ($p < 0.01$). El cambio c.-199C>T, c.-199C>A y c.-198_-196del provocan una reducción en la activación del promotor de *MATN1*, en presencia del trío SOX, junto a SHOX.

2. Búsqueda de mutaciones en el eje *NPPC/NPR2/GMPc* en pacientes con sospecha de DLW o TBI.

2.1 Búsqueda de variantes en *NPR2* en pacientes con DLW o TBI.

Recientemente se ha observado que defectos en heterocigosis en *NPR2* son los causantes del fenotipo de entre un 2–6% de los pacientes con TBI (Amano et al. 2014; Vasques et al. 2013, Wang et al. 2015), al igual que sucede con *SHOX* (Chen et al. 2009). Por lo tanto, existe la posibilidad de que pacientes con características similares a DLW, sin defectos en *SHOX*, presenten cambios en *NPR2*.

Para demostrarlo, se analizaron las secuencias codificantes y las regiones de transición intrón-exón de 242 pacientes con sospecha de DLW y 95 con TBI, ambos sin defectos en *SHOX/PR1*, mediante HRM o NGS y secuenciación Sanger. Se encontraron nueve variantes, ocho cambios sin sentido y una delección de un aminoácido que mantiene la pauta de lectura. Ocho de las variantes se encontraron en pacientes con sospecha de DLW y dos en pacientes con TBI. Las características moleculares, procedencia del paciente, cosegregación y predicción de patogenicidad, de los cambios encontrados se encuentran resumidas en la Tabla 11. Los datos clínicos de cada de cada paciente y sus familiares quedan resumidos en la Tabla 12 (Anexo I).

2.1.1 Variante c.491C>G de *NPR2* (probando 1).

La variante c.491C>G afecta al primer exón de *NPR2* y predice el cambio de aminoácido p.Ala164Gly (Fig. 28). El cambio se encontró en heterocigosis, en un paciente brasileño de un año de edad, que presenta TBI. Se analizó la cosegregación de la variante con el fenotipo de TBI y se observó que la madre, con talla baja, no presenta el cambio (Fig. 28). La variante c.491C>G (rs62637657) ha sido previamente observada en individuos control pero en muy baja frecuencia, concretamente 3/66522 cromosomas de individuos europeos y 1/10379 americanos de origen africano (*Exome Aggregation consortium*, ExAc).

El cambio p.Ala164Gly provoca un cambio de sentido de un aminoácido neutro por otro neutro en el dominio de unión al ligando de NPR-B, además, Ala164 está altamente conservado en vertebrados. Se llevó a cabo una predicción de la patogenicidad de la variante y los cuatro programas utilizados clasificaron el cambio como tolerado.

Tabla 11. Resumen de las nueve variantes de *NPR2* identificadas en diez pacientes con sospecha de DLW o TBI, que no presentan defectos en *SHOX*.

Probando (fenotipo)	ADNc (código de SNP)	Exón	Aminoácido	Dominio afectado	Procedencia	Frecuencia en controles (<i>ExAc</i>)	Cosegreg.	<i>SIFT</i>	<i>Mutation tester</i>	<i>Polyphen</i>	<i>CADD</i>
1 (TBI)	c.491C>G (rs62637657)	1	p.Ala164Gly	Unión al ligando	Brasil	4/121138	No	0.05 Tol.	0.925 Polimorfismo	0.065 Benigno	16.8 Inc.
2 (DLW)	c.766G>T	2	p.Asp256Tyr	Unión al ligando	España	--	Sí	0 Del.	1 Patogénico	0.962 Del.	28.8 Del.
3 (DLW)	c.1262C>T (rs140361919)	6	p.Thr421Met	Unión al ligando	España	10/121322	ND	0 Del.	0.883 Patogénico	0.090 Benigno	23.1 Del.
4 (TBI)	c.1636A>T (rs138315850)	10	p.Asn546Tyr	Quinasa	Brasil	2/121300	NI	0 Del.	0.999 Patogénico	0.885 Del.	23.5 Del.
5 (DLW)	c.1636A>T (rs138315850)	10	p.Asn546Tyr	Quinasa	España	2/121300	ND	0 Del.	0.999 Patogénico	0.885 Del.	23.5 Del.
6 (DLW)	c.1641_1643del	10	p.Val548del	Quinasa	España	ND	Sí	-	-	-	-
7 (DLW)	c.1928G>A	13	p.Gly643Glu	Quinasa	España	--	Sí	0 Del.	1 Patogénico	1.000 Del.	26.7 Del.
8 (DLW)	c.2455C>T*	16	p.Arg819Cys	--	España	3/121406	Sí	0 Del.	1 Patogénico	1.000 Del.	33.0 Del.
9 (DLW)	c.2972A>G	20	p.Glu991Gly	Guanilato ciclasa	España	--	Sí	0 Del.	1 Patogénico	1.000 Del.	33.0 Del.
10 (DLW)	c.3058C>T	21	p.Arg1020Trp	Guanilato ciclasa	España	--	ND	0 Del.	1 Patogénico	1.000 Del.	34.0 Del.

En la tabla se muestran el dominio afectado, la cosegregación y la predicción de patogenicidad de cada variante. Todas las variantes se localizan en aminoácidos altamente conservados. * Esta mutación ha sido previamente descrita en una familia brasileña y su patogenicidad se ha demostrado previamente (Amano et al. 2014). ND: no determinado; NI: no informativo, Tol: tolerado, Del: deletéreo e Inc.: Inconcluyente. *SIFT*, *Mutation tester*, *Polyphen* y *CADD v1.3* son los predictores de patogenicidad *in silico* utilizados en este estudio. La frecuencia en controles representa el número de cromosomas de individuos portadores de cada cambio respecto al número de cromosomas totales analizados por la base de datos *ExAc*, que incluye datos de individuos de diferentes poblaciones (europeos, africanos, asiáticos y latinos).

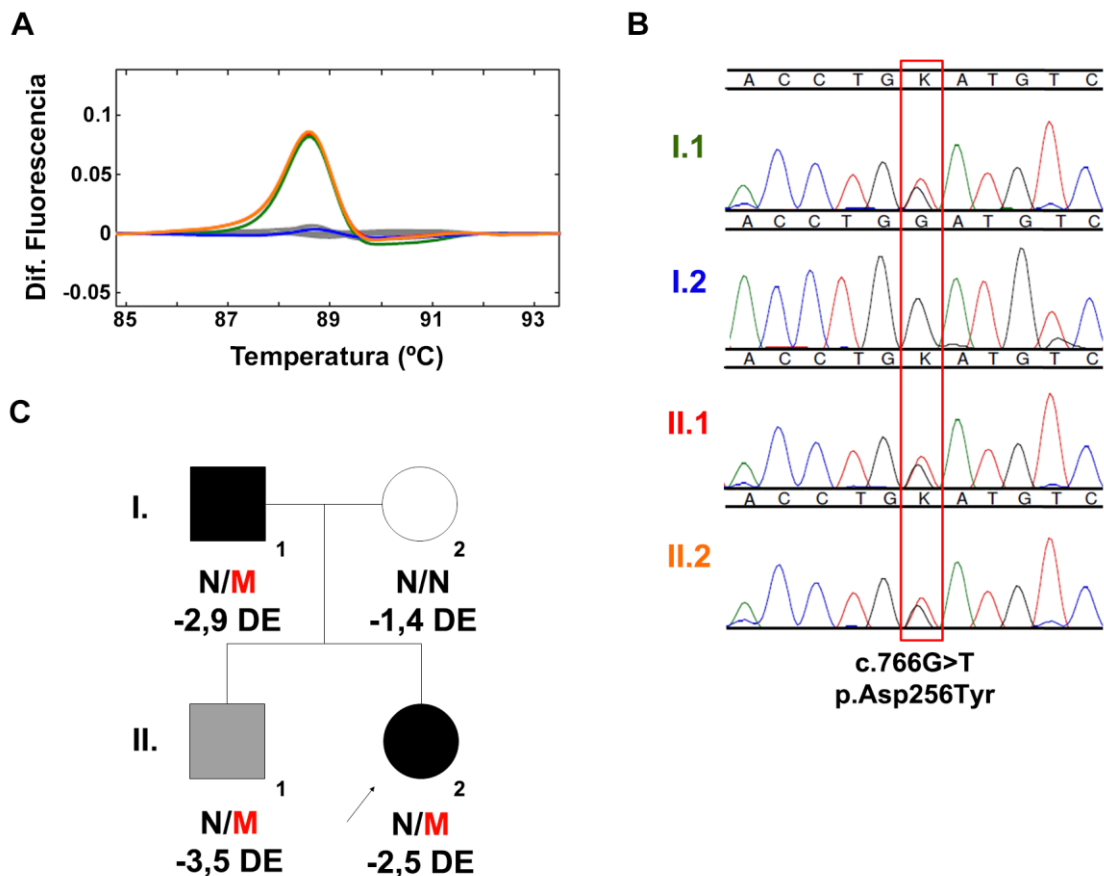


Figura 29. Estudio del cambio c.766G>T (p.Asp256Tyr) de *NPR2* encontrado en el probando 2. (A) Curvas de fusión obtenidas mediante análisis de HRM del índice (II.2, rojo); sus padres, I.1 y I.2 (verde para el padre y azul para la madre); su hermano (II.1, naranja) y muestras control (gris). (B) Electroferograma de la secuenciación del segundo exón de *NPR2* del índice y sus familiares. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El color gris indica TBI y el negro fenotipo similar a DLW. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. El índice (II.2), el padre (I.1) y su hermano (II.1) presentan la variante; los tres presentan TBI. Además I.1 y II.2 también presentan características de DLW.

2.1.3 Variante c.1262C>T de *NPR2* (probando 3).

La variante c.1262C>T (p.Thr421Met) está localizada en el exón 6 de *NPR2* y fue encontrada en heterocigosis (Fig. 30). El paciente con el cambio es un varón de 10 años de edad, que fue referido como posible DLW y presenta talla baja desproporcionada (talla de -3.2 DE), antebrazos cortos y rostro alargado y estrecho. No fue posible llevar a cabo estudios de cosegregación debido a la imposibilidad de conseguir muestras de ADN de sus familiares. El cambio c.1262C>T (rs140361919) ha sido previamente encontrado en individuos control, pero con una frecuencia muy baja, se encontró en 5/66712 cromosomas de individuos europeos, 4/10402 africanos y 1/16510 asiáticos (ExAc).

Como consecuencia de la variante, se genera un cambio de aminoácido en NPR-B de un aminoácido neutro polar a uno neutro apolar. El aminoácido afectado forma parte del dominio de unión al ligando y se encuentra altamente conservado en vertebrados. Tres de las herramientas de predicción de patogenicidad (*SIFT*, *Mutation tester* y *CADD*) lo clasifican como deletéreo, mientras que *Polyphen* lo clasifica como benigno.

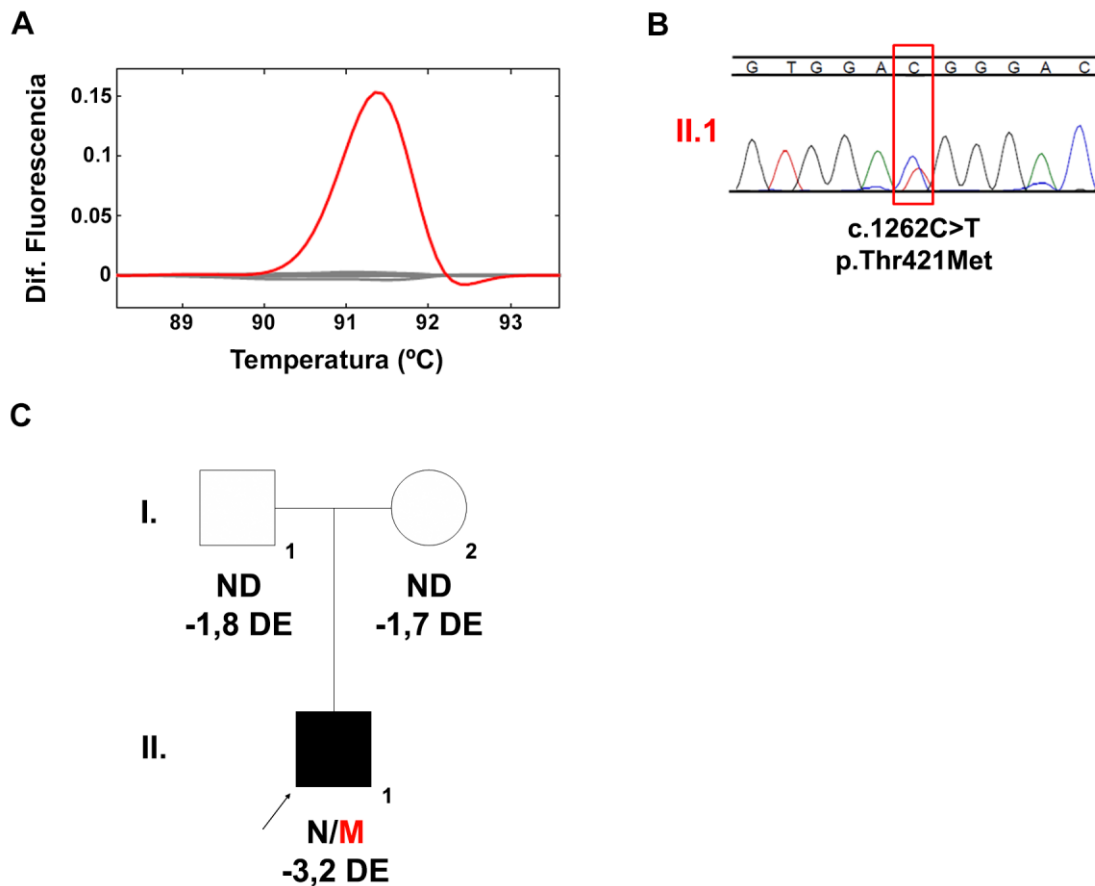


Figura 30. Estudio del cambio c.1262C>T (p.Thr421Met) de *NPR2* presente en el probando 3. (A) Curvas de fusión obtenidas mediante HRM del índice (II.1, rojo) y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 6 de *NPR2* del probando 3. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El color negro indica fenotipo similar a DLW. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. ND: No determinado. El índice presenta el cambio c.1262C>T y un fenotipo similar a DLW.

2.1.4 Variante c.1636A>T de *NPR2* (probandos 4 y 5).

La variante c.1636A>T (p.Asn546Tyr) se localiza en el exón 10 de *NPR2*, fue encontrada en heterocigosis en dos individuos: el probando 4 (TBI), y el probando 5 (DLW) (Fig. 31). El probando 4 es un varón de 12 años de edad, presenta talla baja (-2.8 DE) y retraso del crecimiento óseo. El probando 5 es un varón de 10 años que presenta talla baja desproporcionada (talla de -3.1 DE y E/T patológico), cúbito valgo e hipertrofia muscular. Fue imposible llevar a cabo estudios de cosegregación en ambos pacientes, debido a la falta de datos clínicos y muestras de los familiares. El cambio c.1636A>T ha sido descrito previamente (rs138315850) en 1/66704 cromosomas de individuos europeos y en 1/908 clasificados como de procedencia indeterminada (ExAc).

La variante c.1636A>T provoca un cambio de sentido que provoca el paso de un aminoácido polar por uno aromático. El cambio se localiza en el dominio quinasa de NPR-B, afecta a un aminoácido que está altamente conservado en vertebrados, y ha sido clasificado como patológico por los predictores *in silico*.

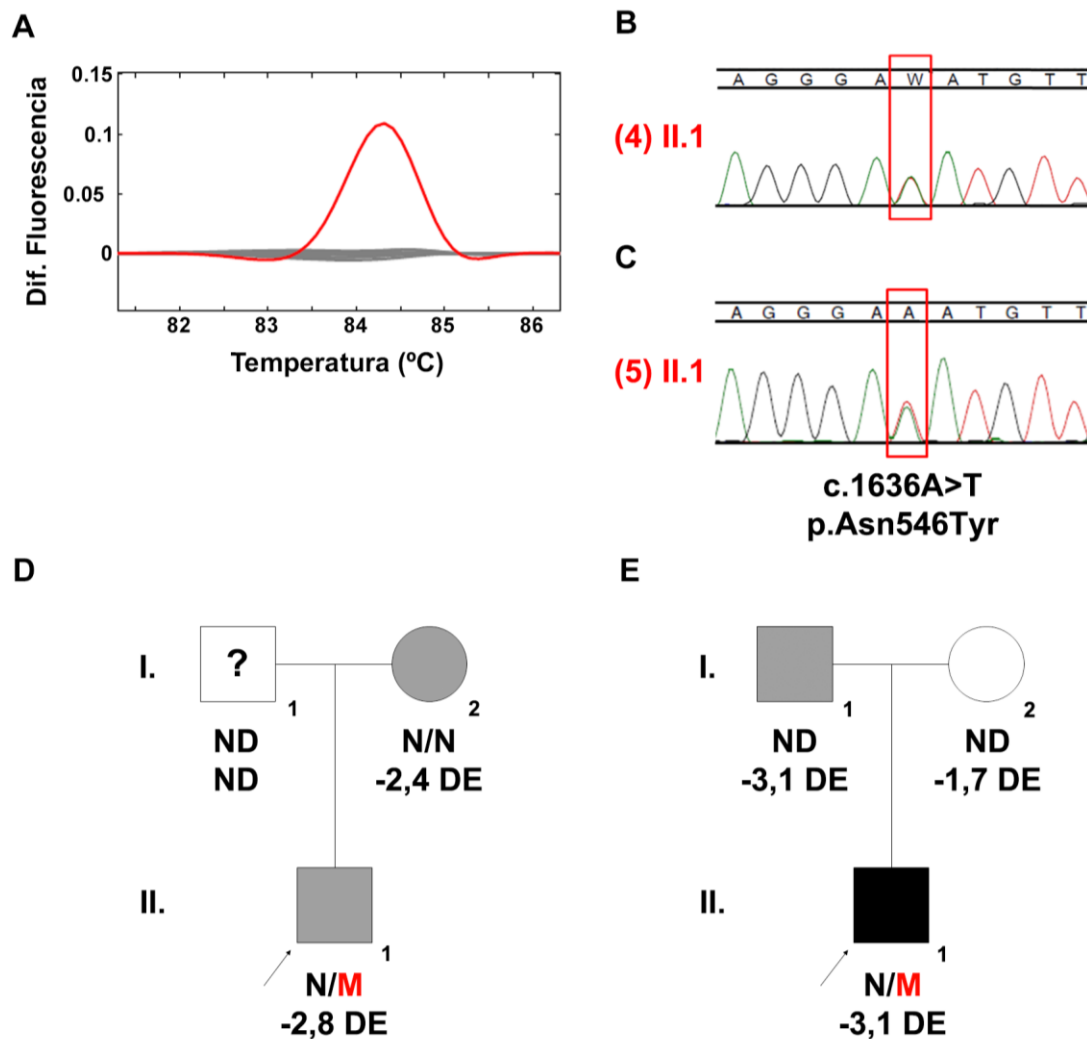


Figura 31. Estudio del cambio c.1636A>T (p.Asn546Tyr) de *NPR2* encontrado en los probandos 4 y 5. (A) Curvas de fusión obtenidas por HRM del probando 5 (II.1, rojo) y muestras control (gris). Electroferograma obtenido de la secuenciación del décimo exón de *NPR2* del probando 4 (B) y del 5 (C). Análisis de cosegregación de la variante en la familia del probando 4 (D) y el probando 5 (E). El color gris indica TBI y el negro fenotipo similar a DLW. Bajo cada individuo se muestra su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. ND: No determinado. El probando 4 presenta el cambio c.1636A>T; mientras que su madre, también con talla baja, no. El probando 5 presenta el cambio y fenotipo similar a DLW.

2.1.5 Variante c.1641_1643del de *NPR2* (probando 6).

El cambio c.1641_1643del (p.Val548del) se localiza en el exón 11 de *NPR2* y se encontró en heterocigosis, en un individuo varón español de 13 años de edad (Fig. 32). Presenta un fenotipo característico de DLW, con talla baja (-2.9 DE), curvatura del radio, acortamiento mesomérico de las extremidades y del 4º metacarpo, y retraso en la edad ósea. Su madre, que tiene talla baja (-2.7 DE), también presenta el cambio c.1641_1643del, mientras que su padre tiene genotipo y fenotipo normales, por lo tanto, el fenotipo cosegrega con la variante (Fig. 32).

El cambio c.1641_1643del no afecta a la pauta de lectura pero causa una delección de la Val548, altamente conservada en vertebrados.

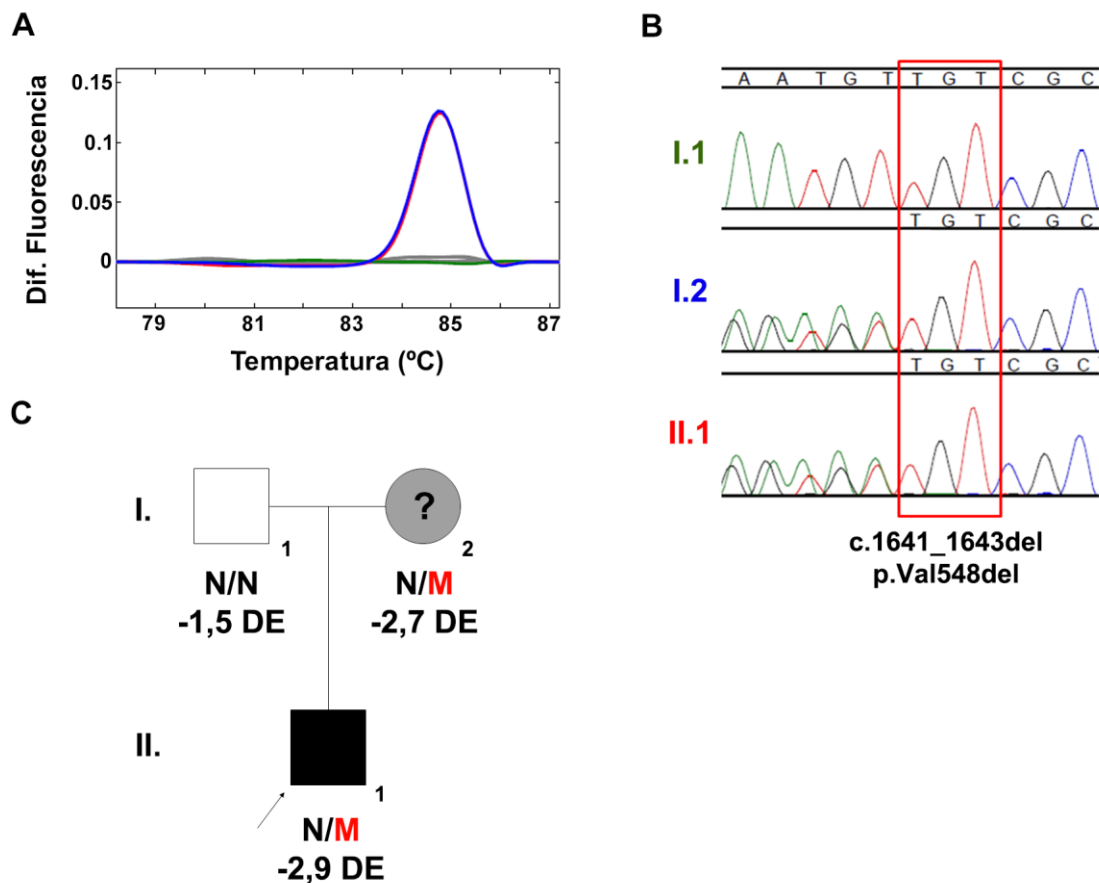


Figura 32. Estudio del cambio c.1641_1643del (p.Val548del) encontrado en *NPR2*, en el probando 6. (A) Curvas de fusión obtenidas mediante HRM del índice (II.1, rojo); sus padres, I.1 y I.2 (verde para el padre y azul para la madre) y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido al secuenciar el exón 10 de *NPR2* del índice y sus familiares. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El color gris indica TBI y el negro fenotipo similar a DLW, el signo de interrogación indica que se desconocen los datos clínicos del individuo. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. El índice y su madre presentan la variante y ambos presentan fenotipo de talla baja.

2.1.6 Variante c.1928G>A de *NPR2* (probando 7).

El cambio c.1928G>A (p.Gly643Glu) fue encontrado en heterocigosis, en el exón 13 de *NPR2* (Fig. 33). El probando 7, de procedencia española, tiene de diez años de edad y fue clasificado como posible DLW, ya que presenta talla baja desproporcionada (talla de -2.5 DE y E/T patogénico). Se observó que su padre, que presenta una talla baja más severa (-3.2 DE) pero miembros proporcionados, es también portador del cambio c.1928G>A, por lo tanto existe cosegregación entre el fenotipo de talla baja y la variante (Fig. 33). El cambio c.1928G>A no ha sido observado previamente en controles (ExAc).

La variante c.1928G>A provoca un cambio de sentido que provoca el paso de un aminoácido neutro por uno con carga negativa. El cambio se localiza en el dominio quinasa de NPR-B, afecta a un aminoácido que está altamente conservado en vertebrados, y ha sido clasificado como deletéreo por los predictores *in-silico*.

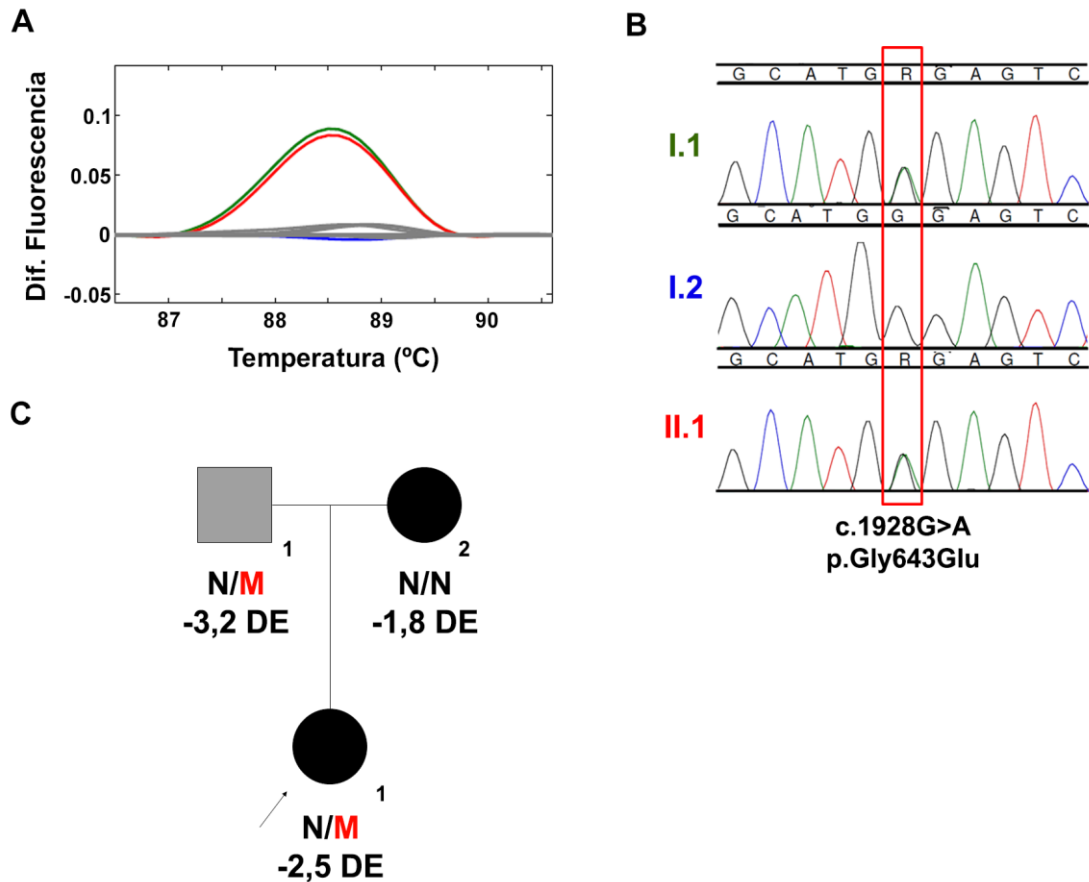


Figura 33. Estudio de la variante c.1928G>A (p.Gly643Glu) encontrada en *NPR2*, en el probando 7. (A) Curvas de fusión obtenidas por HRM del índice (II.1, rojo); sus padres, I.1 y I.2 (verde para el padre y azul para la madre); y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 13 de *NPR2* del índice y sus familiares. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El negro indica fenotipo similar a DLW y el gris TBI. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. El índice y su padre presentan la variante y ambos presentan talla baja.

2.1.7 Variante c.2455C>T de *NPR2* (probando 8).

El cambio c.2455C>T (p.Arg819Cys) fue encontrado en heterocigosis, en el exón 16 de *NPR2* (Fig. 34). El probando 8 es de procedencia española, tiene diez años de edad y fue clasificado como posible DLW, presenta talla baja proporcionada (-2.3 DE) e hipertrofia muscular. Se observó que la madre, que presenta una talla baja desproporcionada más severa (-3.0 DE), tiene también el cambio c.2455C>T, por lo tanto existe cosegregación entre el fenotipo y la variante (Fig. 24). El cambio c.2455C>T ha sido descrito previamente en la base de datos ExAc pero en muy baja frecuencia, ha sido encontrado en 2/66740 cromosomas europeos (No fineses) y en 1/11574 latinos, por tanto, 3/121406 cromosomas analizados.

Es muy importante el hecho de que esta variante ha sido previamente descrita en un individuo con talla baja proporcionada (-2.4 DE) y acortamiento de los metacarpos y se ha demostrado su patogenicidad mediante estudios funcionales (Vasques et al. 2013).

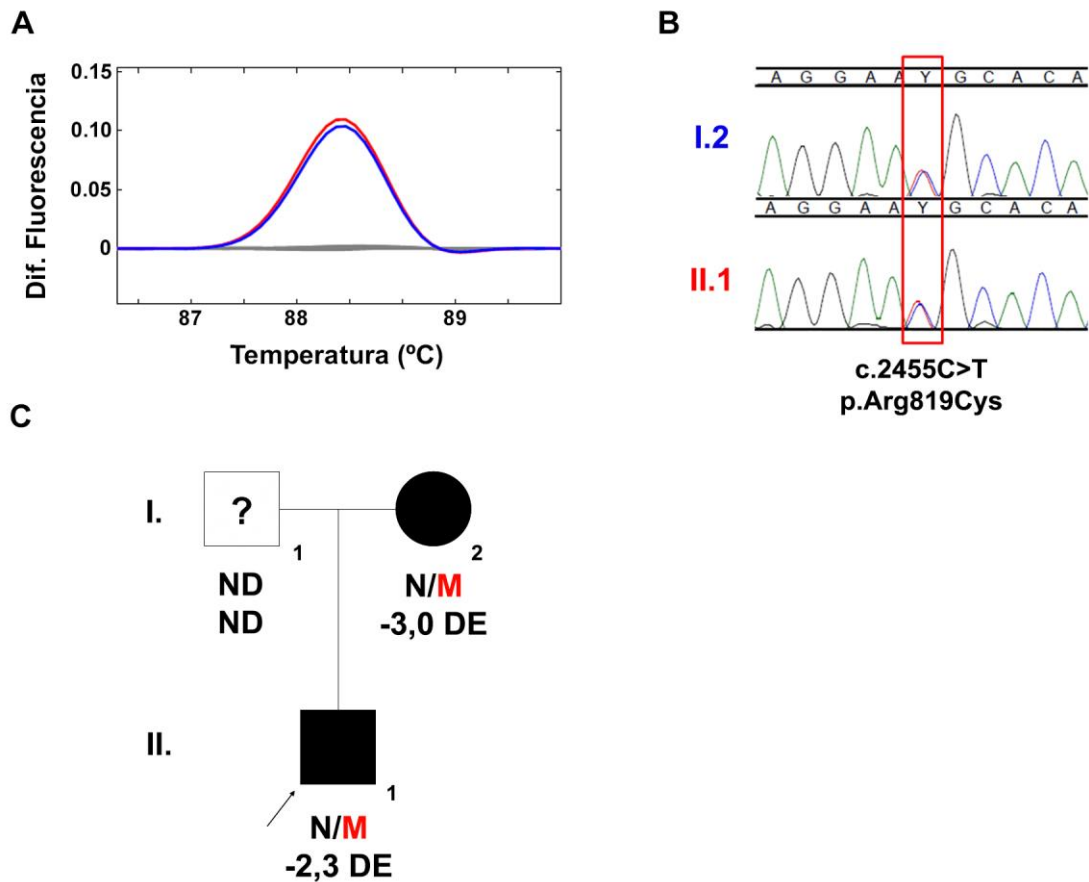


Figura 34. Estudio de la variante c.2455C>T (p.Arg819Cys) encontrada en *NPR2*, en el probando 8. (A) Curvas de fusión obtenidas por HRM del índice (II.1, rojo); su madre (I.2, azul) y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 16 de *NPR2* del índice y su madre. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El negro indica fenotipo similar a DLW, el signo de interrogación indica que se desconocen los datos clínicos del individuo. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. ND: No determinado. El índice y su madre presentan la variante y fenotipo similar a DLW.

2.1.8 Variante c.2972A>G de *NPR2* (probando 9).

La variante c.2972A>G (p.Glu991Gly) afecta al exón 20 de *NPR2* y fue encontrada en heterocigosis, mediante NGS usando un panel de diseño propio que cubre 315 genes y regiones que causan displasias esqueléticas. Posteriormente fue confirmada por HRM y secuenciación (Fig. 35). La paciente fue remitida con seis años de edad como un posible caso de DLW, presentaba talla baja proporcionada (-2.3 DE), paladar hendido, acortamiento de la 5ª falange, hipertrofia muscular, malposición dental y epífisis en forma de cono. Se analizó la presencia de la variante c.2972A>G en sus familiares y se observó que está presente, tanto en sus dos hermanos, como su madre (Fig. 35). Todos presentan características de DLW comunes con la paciente por lo tanto, la variante c.2972A>G cosegrega con el fenotipo. El cambio c.2972A>G no ha sido descrito previamente.

La variante c.2972A>G da lugar a un cambio de sentido de un aminoácido con carga negativa por uno con carga neutra apolar. El aminoácido afectado está altamente conservado en vertebrados. El cambio se localiza en el dominio guanilato ciclasa de NPR-B, encargado de sintetizar GMPc. Los predictores de patogenicidad *in silico* clasificaron dicha variante como patogénica.

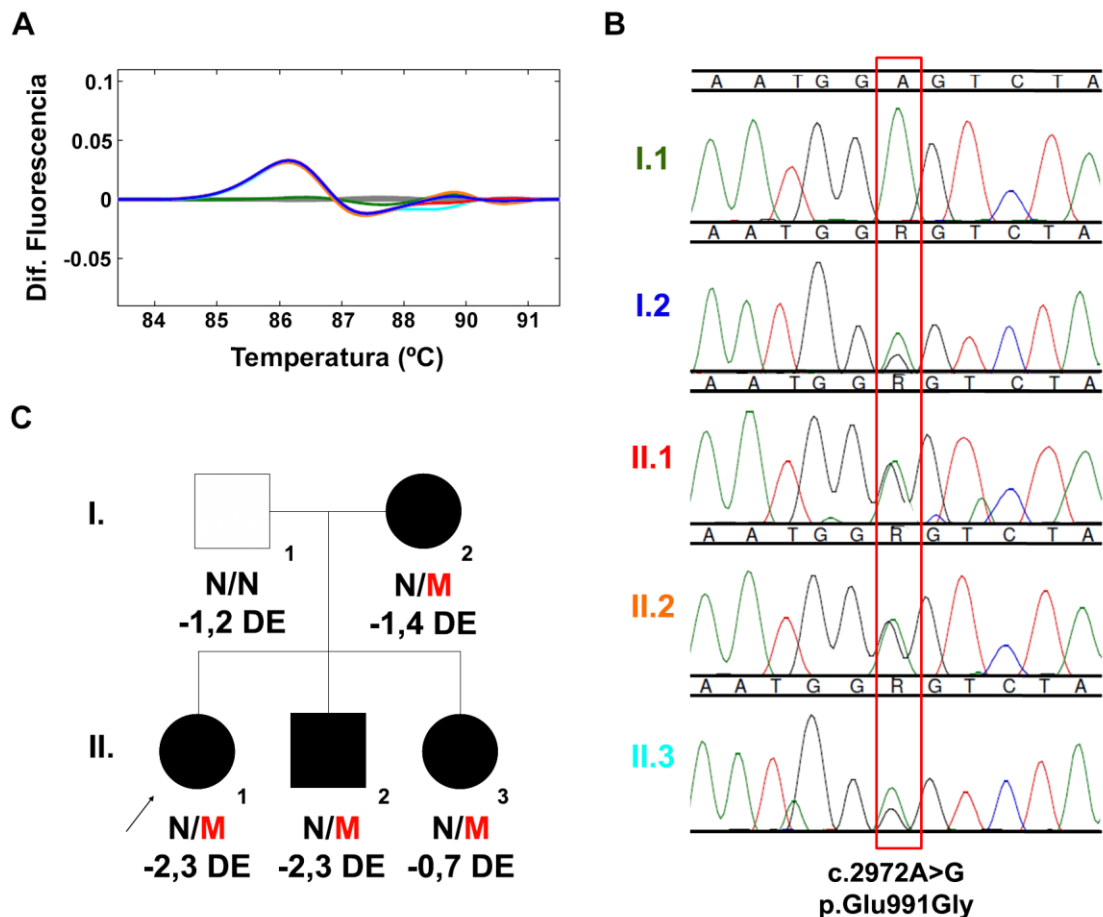


Figura 35. Análisis de la variante c.2972A>G (p.Glu991Gly) de *NPR2* encontrada en el probando 9. (A) Curvas de fusión obtenidas por HRM del índice (II.2, rojo), sus padres, I.1 y I.2 (verde para el padre y azul para la madre), su hermano (II.2, naranja), su hermana (II.3, cian) y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 20 de *NPR2* del índice y sus familiares. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El color negro indica fenotipo similar a DLW. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. El índice, sus hermanos y su madre tienen el cambio c.2972A>G, todos presentan características de DLW.

2.1.9 Variante c.3058C>T de *NPR2* (probando 10).

La variante c.3058C>T (p.Arg1020Trp) afecta al exón 21 de *NPR2* y fue encontrada en heterocigosis (Fig. 36), en una niña de nueve años de edad, que presenta características típicas de la DLW, como son proporciones corporales alteradas (E/T de 0.956), acortamiento mesomélico de las extremidades, curvatura de las extremidades inferiores, braquidactilia y paladar hendido. Además, presenta otra serie de características: extensión limitada de los codos, frente aplanada, hipertelorismo, estrabismo y malposición dental. Por otro lado, su madre, que también tiene proporciones corporales alteradas, además tiene sordera. Fue imposible llevar a cabo estudios de cosegregación en la familia, debido a la falta de muestras de ADN de los familiares (Fig. 36). Esta variante no ha sido descrita previamente.

La variante c.3058C>T da lugar a un cambio de sentido en NPR-B, se pasa de una Arginina a un Triptófano en la posición 1020, es decir, de un aminoácido con carga positiva a un aromático. El aminoácido afectado se localiza en el dominio guanilato ciclase y está altamente conservado en vertebrados. Los cuatro predictores de patogenicidad utilizados lo clasifican como patogénico.

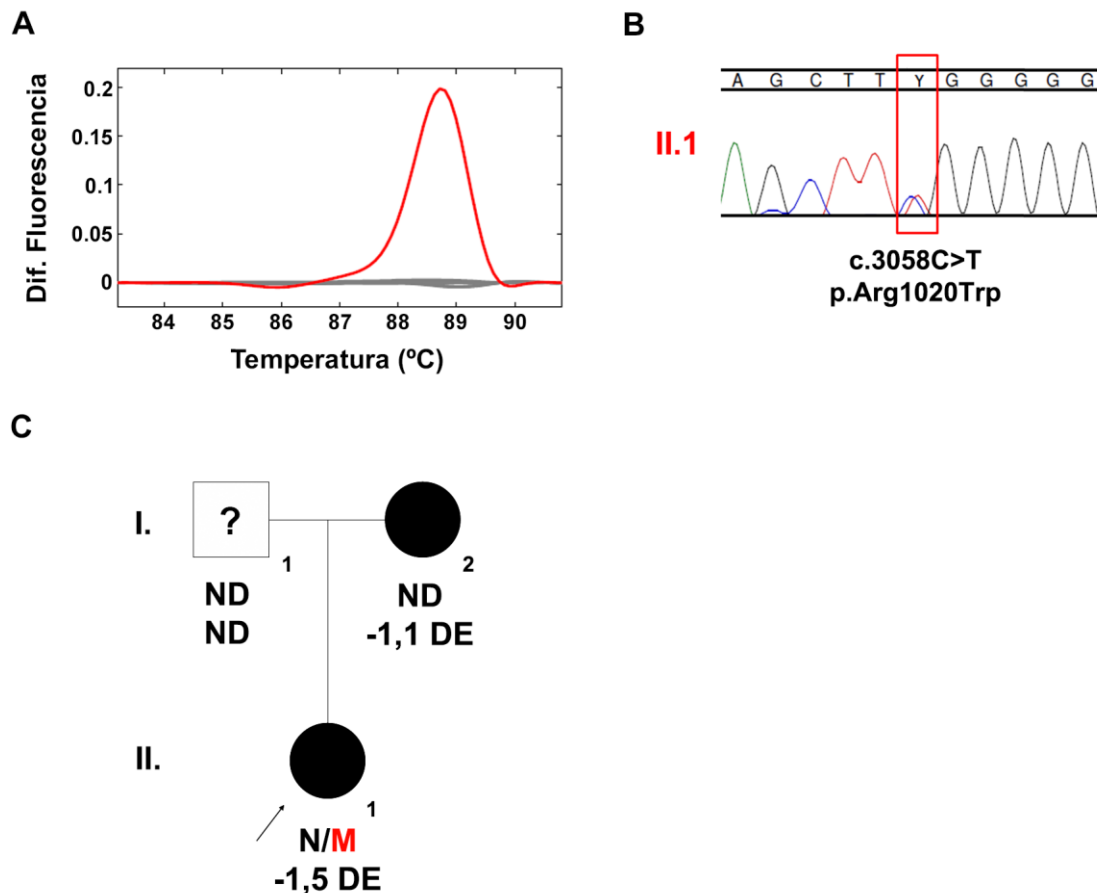


Figura 36. Estudio de la variante c.3058C>T (p.Arg1020Trp) de *NPR2* encontrada en el probando 10. (A) Curvas de fusión obtenidas por HRM del índice (II.1, rojo) y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido de la secuenciación del exón 21 de *NPR2* del probando 9. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El color negro indica fenotipo similar a DLW, el signo de interrogación indica que se desconocen los datos clínicos del individuo. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. ND: No determinado. El índice presenta el cambio c.3058C>T, además de un fenotipo similar a DLW.

2.2 Caracterización funcional de las variantes encontradas en *NPR2*.

Se determinó la patogenicidad de las variantes de *NPR2* previamente identificadas en las dos cohortes de pacientes, mediante dos ensayos funcionales: inmunocitoquímica y ELISA.

2.2.1 Estudio de la localización intracelular de las variantes encontradas en *NPR2*.

Estudios previos demostraron que mutaciones en *NPR2* descritas en pacientes pueden provocar que dicho receptor sea incapaz de alcanzar la membrana plasmática, quedando retenido en el RE (Hume et al. 2009). Para determinar si las variantes encontradas en *NPR2* producen el mismo efecto, se llevó a cabo un ensayo de inmunocitoquímica en células U2OS previamente transfectadas con vectores de expresión de *NPR2* silvestre o con cada una de las variantes. Los resultados muestran que las variantes p.Ala164Gly, p.Asn546Tyr, p.Val548del y p.Glu991Gly presentan una localización intracelular normal, en la membrana plasmática (Fig. 37). Por otro lado, las variantes p.Asp256Tyr, p.Thr421Met, p.Gly643Glu y p.Arg1020Trp, quedan retenidas en el RE (Fig. 37).

2.2.2 Análisis de la actividad guanilato ciclasa de las variantes de NPR-B encontradas.

Posteriormente, se analizó la capacidad de las variantes de mantener la actividad guanilato ciclasa, es decir, de sintetizar GMPc. Para ello se realizó un ensayo ELISA, que mide los niveles intracelulares de GMPc en células que sobreexpresan NPR-B silvestre, las variantes de NPR-B encontradas o el mutante p.Arg110Cys, que no presenta actividad guanilato ciclasa (Amano et al. 2014). Previamente a su lisis, las células fueron estimuladas con CNP durante 20 minutos, para inducir la síntesis de GMPc. Se observó que las variantes p.Asp256Tyr, p.Val548del, p.Gly643Glu, p.Glu991Gly y p.Arg1020Trp muestran una ausencia total de actividad guanilato ciclasa, similar a la presentada por el mutante p.Arg110Cys, mientras que p.Thr421Met muestra una reducción de la actividad guanilato ciclasa del 61% (Fig. 38A). Por otro lado, p.Ala164Gly y p.Asn546Tyr causan una reducción de sólo el 19% y 31% respectivamente (Fig. 38A). La patogenicidad del cambio p.Arg819Cys ha sido estudiada previamente (Vasques et al. 2013).

Como las variantes han sido encontradas en heterocigosis, se analizó si eran capaces de ejercer un efecto dominante negativo, para ello se cotransfectó cada variante junto con NPR-B silvestre, con una proporción de 1:1. Seis mutantes, p.Asp256Tyr, p.Thr421Met, p.Val548del, p.Gly643Glu, p.Glu991Gly y p.Arg1020Trp presentaron una reducción significativa de la actividad guanilato ciclasa comparada con NPR-B silvestre (Fig. 38B). Sin embargo, las variantes p.Ala164Gly y p.Asn546Tyr no mostraron ninguna reducción, sugiriendo que no tienen efecto dominante negativo (Fig. 38B).

Los datos obtenidos en los análisis funcionales de las variantes analizadas, incluyendo la mutación p.Arg819Cys, previamente reportada, quedan resumidos en la Tabla 13.

2.2.3 Análisis de la capacidad de BNP de activar NPR-B.

Por último, se intentó determinar la actividad guanilato ciclasa de NPR-B cuando es activada por un ligando diferente, BNP, una diana de SHOX (Marchini et al. 2007) y compararla respecto a CNP. Se vio que los niveles de GMPc en células estimuladas por BNP son diez veces menores que con CNP (Fig. 39A). Además se observó que los mutantes p.Val548del y p.Glu991Gly mostraron una reducción significativa de la actividad guanilato ciclasa en presencia de BNP con respecto a NPR-B silvestre, al igual que sucede con CNP (Fig. 39B).

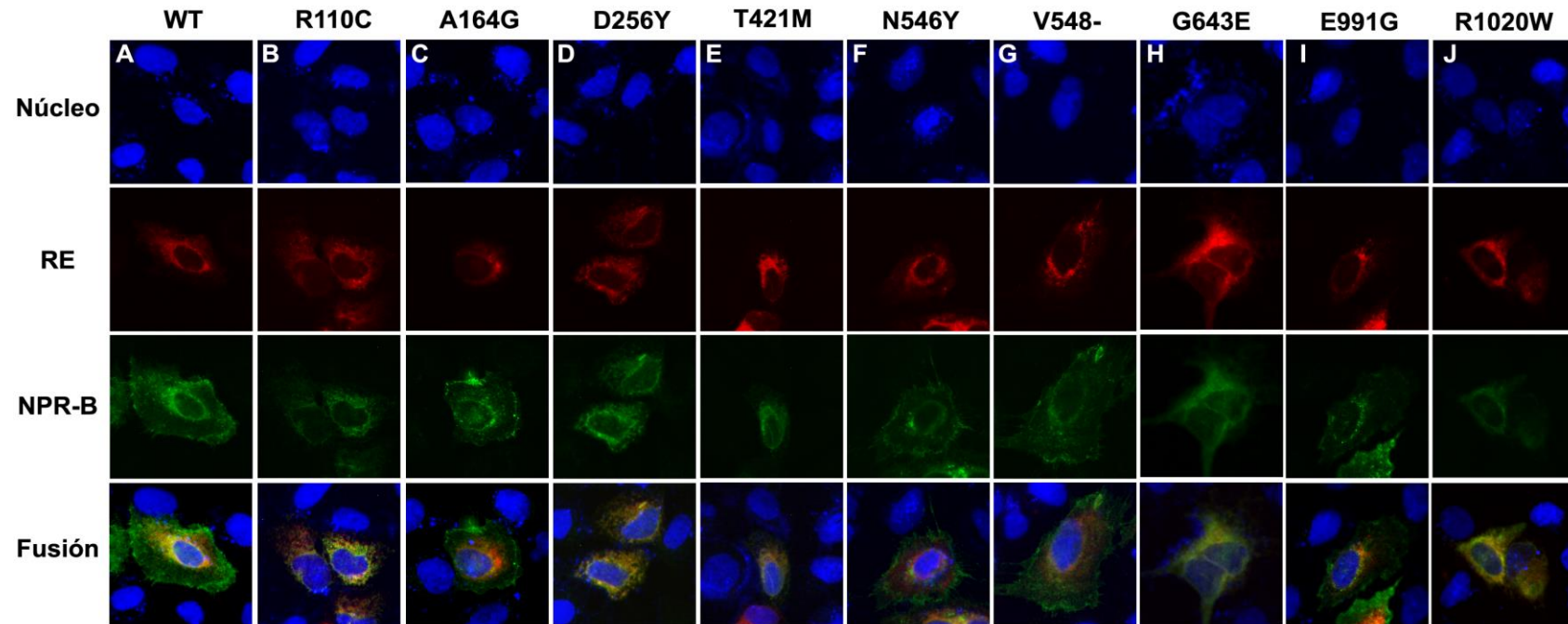


Figura 37. Localización intracelular de las variantes de NPR-B. Se transfectaron células U2OS con vectores de expresión de NPR-B silvestre (A); el mutante de NPR-B p.Arg110Cys, el control de retención en el Retículo Endoplasmático (RE) (B) o los mutantes identificados en nuestro estudio (C-J). Se muestra la localización intracelular de NPR-B (en verde); CALR, un marcador de RE (en rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). En la cuarta fila, se muestra la fusión de las tres imágenes anteriores. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 20X. Las variantes de NPR-B: p.Ala164Gly (A164G), p.Asn546Tyr (N546Y), p.Val548del (V548-) y p.Glu991Gly (E991G) consiguen alcanzar la membrana plasmática, mientras que p.Asp256Tyr (D256Y), p.Thr421Met (T421M), p.Gly643Glu (G643E) y p.Arg1020Trp (R1020W) quedan retenidas en el RE. Se llevaron a cabo dos réplicas independientes obteniendo los mismos resultados.

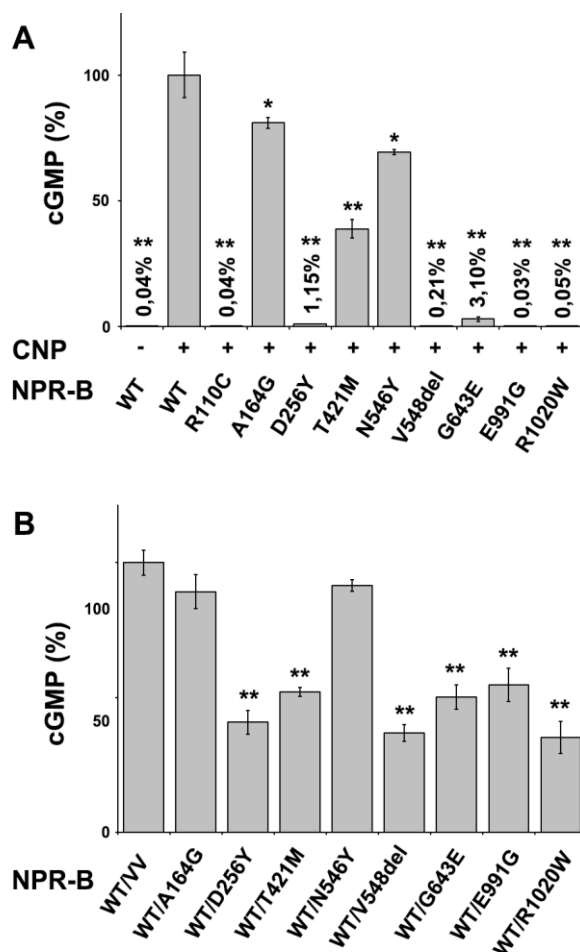


Figura 38. Análisis de la actividad guanilato ciclasa de los cambios encontrados en NPR-B. (A) Actividad guanilato ciclasa de células COS-7 transfectadas con vectores de expresión de NPR-B silvestre (WT) o las variantes: p.Ala164Gly (A164G), p.Asp256Tyr (D256Y), p.Thr421Met (T421M), p.Asn546Tyr (N546Y), p.Val548del (V548del), p.Gly643Glu (G643E), p.Glu991Gly (E991G) y p.Arg1020Trp (R1020W) y el control positivo p.Arg110Cys (R110C); en presencia de CNP. La actividad guanilato ciclasa dependiente de CNP de cada mutante se representa como porcentaje respecto al NPR-B silvestre (100%). Todos los mutantes mostraron una reducción de la actividad guanilato ciclasa. (B) Actividad cGMP de células COS-7 transfectadas con una proporción de 1:1 de vector de expresión vacío (pcDNA3.1, VV) y NPR-B silvestre o los mutantes, previamente expuestas a CNP. La actividad guanilato ciclasa dependiente de CNP de cada mutante se representa como porcentaje de actividad respecto a las células transfectadas con NPR-B silvestre y el vector vacío (100%). Cinco mutantes mostraron efecto dominante negativo. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y se hicieron dos réplicas independientes. Las diferencias significativas con respecto a los valores de NPR-B silvestre aparecen marcadas con asteriscos (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

Tabla 13. Caracterización funcional de las mutaciones de NPR-B.

Mutación en NPR-B	Retención en el RE	Síntesis de GMPc (% del WT)	Efecto dominante negativo en la síntesis de GMPc	Cosegregación	Patogenicidad
A164G	-	81	-	No	No patológico
D256Y	+	1,15	+	Sí	Patológico
T421M	+	39	+	ND	Patológico
N546Y	-	69	-	ND	No patológico
V548del	-	0,20	+	Sí	Patológico
G643E	+	3,10	+	Sí	Patológico
R819C*	-	~2	+	Sí	Patológico
E991G	-	0,03	+	Sí	Patológico
R1020W	+	0,05	+	ND	Patológico

*Estudios funcionales descritos previamente (Vasques et al. 2013).

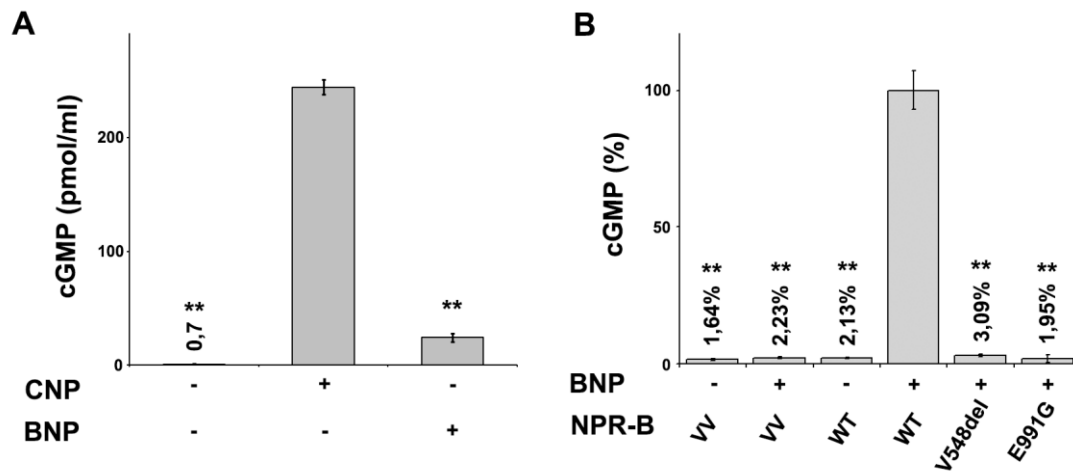


Figura 39. Análisis de la capacidad de BNP de activar la actividad guanilato ciclasa. (A) Estudio de los niveles intracelulares de GMPC en presencia de CNP o BNP en células COS-7 que sobreexpresan NPR-B silvestre. Los niveles de GMPC se representan en pmol/ml. Las células expuestas a CNP mostraron una cantidad de GMPC 10 veces mayor que las expuestas a BNP. (B) Actividad guanilato ciclasa de células COS-7 transfectadas con el vector vacío (pcDNA3.1, VV), vectores de expresión de NPR-B silvestre (WT) o los mutantes p.Val548del (V548del) y p.Glu991Gly (E991G), en presencia o ausencia de BNP. La actividad guanilato ciclasa dependiente de BNP de cada mutante se representa como porcentaje respecto al NPR-B silvestre (100%). Los mutantes analizados mostraron una reducción de la actividad guanilato ciclasa mediada por BNP. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y se hicieron dos réplicas independientes. Las diferencias significativas aparecen marcadas con asteriscos (** $p < 0.01$).

2.3 Búsqueda de variantes en *NPPC* en pacientes con DLW y TBI.

Existen indicios suficientes que apuntan a que *NPPC*, que codifica CNP, el ligando del receptor NPR-B, puede ser un gen determinante de la talla final (Lanktree et al. 2011; Gudbjartsson et al. 2008; Soranzo et al. 2009; Boccardi et al. 2007; Tassano et al. 2013), pero hasta ahora no se han encontrado mutaciones en *NPPC* que se puedan asociar con alguna enfermedad en humanos. Por otro lado, hemos encontrado nueve mutaciones en *NPR2*, que codifica el receptor de CNP, en pacientes con DLW. Por ello, nuestra hipótesis se centra en que defectos en *NPPC* pueden ser los causantes del fenotipo presentado por pacientes con características de DLW o TBI, que no presentan defectos en *SHOX*/PAR1.

Para comprobarlo, se estudiaron las secuencias codificantes y las regiones de transición intrón-exón de 242 pacientes con sospecha de DLW y 95 con TBI sin defectos en *SHOX*/PAR1. Se utilizó la técnica de HRM, junto con secuenciación Sanger y se encontró una variante en heterocigosis, c.349C>G (p.Arg117Gly).

2.3.1 Variante c.349C>G de *NPPC* (probando 11).

La variante c.349C>G (p.Arg117Gly) fue encontrada en heterocigosis, en el exón 2 del gen *NPPC*, usando la técnica de HRM y secuenciación Sanger (Fig. 30). El cambio afecta a una paciente de procedencia española, que fue clasificada como posible DLW. La paciente fue remitida con 12 años de edad y presentaba talla baja proporcionada (-2,3 DE); pies y manos pequeños, con acortamiento del 4º metacarpo; e hipertelorismo. La madre presenta también talla baja proporcionada (-2.6 DE) y manos y pies muy pequeños. Además, tiene antecedentes familiares con el mismo fenotipo. Por otro lado, el padre presenta una talla en el límite de la normalidad (-1,9 DE) y manos toscas (Tabla 14, Anexo I). La madre también tiene la variante c.349C>G en heterocigosis, mientras que el padre no presenta ningún cambio en *NPPC* (Fig. 40). Además, los familiares de la rama materna que tienen la variante c.349C>G,

tienen también talla baja o talla baja con braquidactilia. Por lo tanto, el cambio cosegrega con la talla baja familiar (Fig. 40).

Para descartar la presencia de cambios en otros genes que puedan dar lugar al fenotipo presentado por la paciente con el cambio en *NPPC*, se llevó a cabo una búsqueda de mutaciones mediante el panel de NGS de displasias esqueléticas, (SkeletalSeq.V3). Se confirmó la variante en *NPPC*, y además no se identificó ningún cambio en otro gen que pudiera explicar el fenotipo presentado por la paciente.

El cambio no ha sido descrito previamente, ya que no aparece en la base de datos ExAc, ni está presente en una cohorte de 264 individuos con talla normal de origen español. La variante c.349C>G provoca un cambio de aminoácido en la posición 117 de CNP, de Arginina a Glicina. Este aminoácido forma parte de la estructura en forma de anillo necesaria para que CNP se una a su receptor (Fig. 40). El cambio p.Arg117Gly provoca una variación de la carga de la proteína, al pasar de un aminoácido con carga positiva a uno neutro, además hay una gran diferencia de tamaño entre ambos aminoácidos. Dicha Arginina se encuentra altamente conservada en vertebrados. Los predictores *SIFT* (0, deletéreo), *Mutation tester* (1, patogénico), *Polyphen* (1.00, deletéreo) y *CADD v1.3* (31, patogénico) clasificaron el cambio p.Arg117Gly como patogénico.

2.3.1 Variante c.355G>T de *NPPC*, encontrada por un grupo colaborador (probando 12).

La variante p.Arg117Gly podría ser la primera mutación encontrada en *NPPC*. La gran importancia de este hallazgo, nos llevó a contactar con varios grupos colaboradores internacionales, con la finalidad de encontrar más mutaciones que afecten a dicho gen. El grupo del Dr. Alexander Jorge, Universidad Sao Paolo, Brasil, encontró otro cambio puntual en *NPPC*, c.355G>T (p.Gly119Cys), mediante el análisis de exomas (NGS). El cambio fue encontrado en una familia de procedencia brasileña estudiada por talla baja. El cambio no está presente en el índice, pero sí en su hermana y su padre. El índice presenta talla baja, pero cercana al límite con la normalidad (-2,1 DE), aún sigue creciendo y se espera que alcance una talla final normal. La hermana y su padre, ambos con el cambio p.Gly119Cys, presentan talla baja (ambos tienen una talla de -2,8 DE) y manos pequeñas (Fig. 41A y Tabla 14, Anexo I). El cambio no aparece en la base de datos ExAc. No se observaron otras mutaciones en otros genes que pudieran dar lugar al fenotipo presentado por el índice y sus familiares.

La variante c.355G>T provoca un cambio de aminoácido en la posición 119 de CNP, de Glicina a Cisteína, que forma parte de la estructura en forma de anillo necesaria para que CNP se una a su receptor (Fig. 41B). Dicho aminoácido se encuentra altamente conservado en vertebrados. Los predictores *SIFT* (0, deletéreo), *Mutation tester* (1, patogénico), *Polyphen* (1.00, deletéreo) y *CADD v1.3* (31, patogénico) clasificaron el cambio p.Arg117Gly como patogénico.

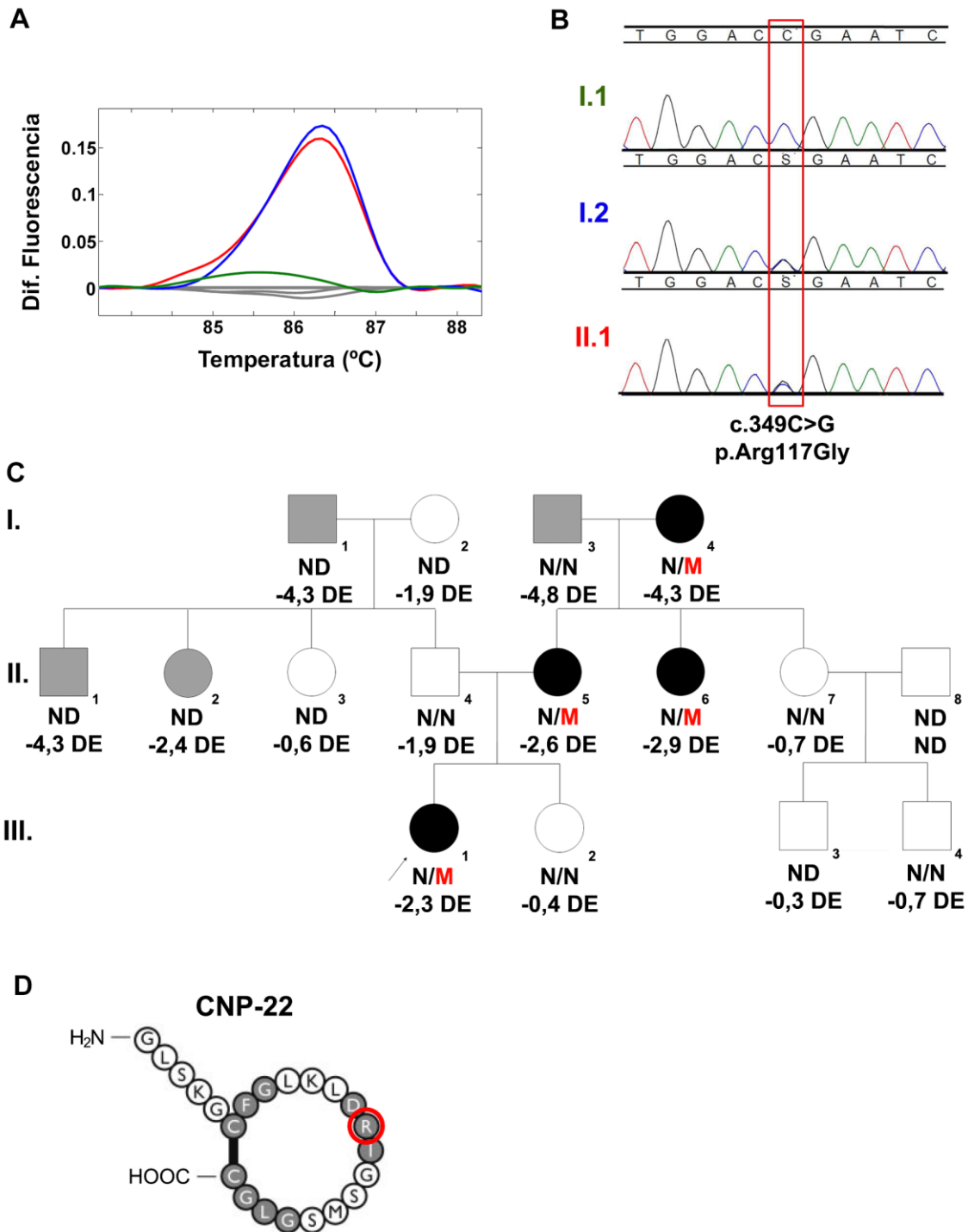


Figura 40. Estudio del cambio c.349C>G (p.Arg117Gly) encontrado en *NPPC*, en el probando 11. (A) Curvas de fusión obtenidas mediante HRM del índice (II.1, rojo); sus padres, I.1 y I.2 (verde para el padre y azul para la madre) y muestras control (gris). (B) Electroferograma obtenido al secuenciar el exón 2 de *NPR2* del índice y sus familiares. (C) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El negro indica un fenotipo de talla baja con braquidactilia y el gris indica TBI. Bajo cada individuo se muestra su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. (D) Estructura proteica del anillo funcional de CNP compuesto por 22 aminoácidos. En rojo aparece marcado el aminoácido afectado por el cambio p.Arg117Gly y en gris se indican los aminoácidos conservados en los tres péptidos natriuréticos, ANP, BNP y CNP (Potter et al. 2006). El índice, su madre y su abuela materna presentan la variante y talla baja con braquidactilia.

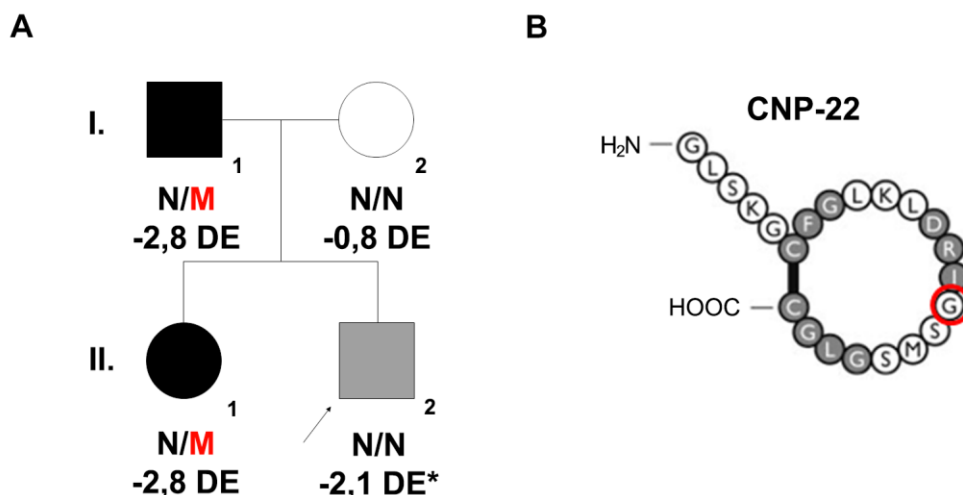


Figura 41. Estudio del cambio c.355G>T (p.Gly119Cys) encontrado en *NPPC*, por un grupo colaborador, en el probando 12. (A) Análisis de cosegregación de la variante con el fenotipo. El negro indica un fenotipo de talla baja con manos pequeñas y el gris indica TBI. Bajo cada individuo se indica su genotipo (N para normal y M, en rojo, para mutado) y su talla en DE. * El paciente continúa creciendo y se predice que alcance una talla final dentro de la normalidad. (B) Estructura proteica del anillo funcional de CNP. En rojo aparece marcado el aminoácido afectado por el cambio p.Gly119Cys y en gris se indican los aminoácidos conservados en los tres péptidos natriuréticos, ANP, BNP y CNP (Potter et al. 2006). La hermana del índice y su padre presentan la variante y ambos presentan fenotipo de talla baja con manos pequeñas.

2.3.2 Caracterización funcional de los cambios p.Arg117Gly y p.Gly119Cys, encontrados en *NPPC*.

Para demostrar la patogenicidad de los cambios encontrados en *NPPC*, se intentó determinar su capacidad de activar NPR-B, su receptor. Para ello, las células COS-7 fueron transfectadas con vectores de expresión de *NPR2* y de *NPPC* silvestre, con el cambio c.349C>G o con c.355G>T. De esta forma, las células expresarían ambos, permitiendo interaccionar a CNP, el ligando, con NPR-B, su receptor. La activación de NPR-B fue medida mediante un ensayo ELISA de GMPc, que mide los niveles intracelulares de GMPc, producto directo de la actividad de NPR-B. Se observó que CNP con los cambios p.Arg117Gly o p.Gly119Cys, no es capaz de activar NPR-B y muestra unos niveles similares a los presentados por células que no expresan NPR-B (Fig. 42).

Puesto que los cambios p.Arg117Gly y p.Gly119Cys fueron encontrados en heterocigosis, se intentó demostrar su efecto dominante negativo. Para ello, se realizó un experimento similar al anterior pero transfectando las células con *NPPC* silvestre y con uno de los mutantes, p.Arg117Gly o p.Gly119Cys, al mismo tiempo, usando una proporción 1:1. Los resultados muestran que tanto la presencia de CNP con el cambio p.Arg117Gly, como con p.Gly119Cys, provoca una reducción significativa de la activación de NPR-B también en heterocigosis (Fig. 42).

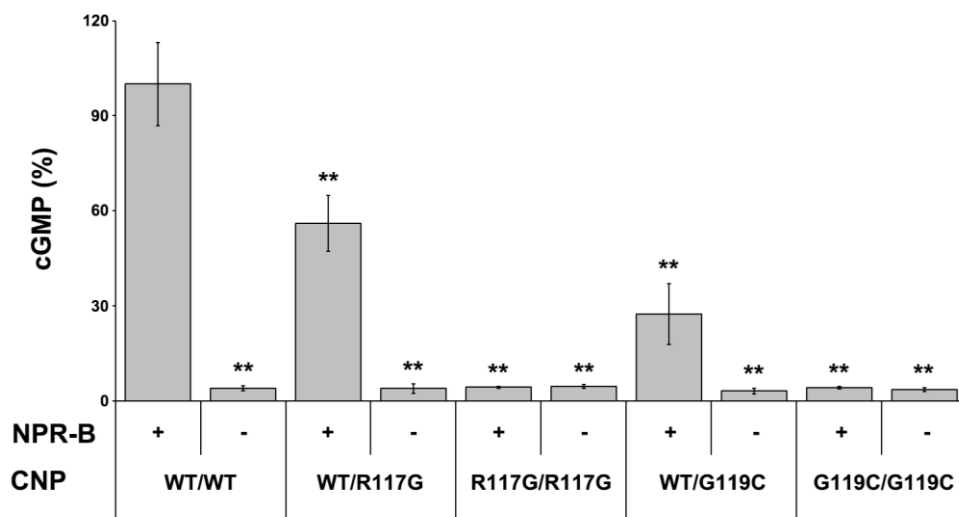


Figura 42. Análisis de la patogenicidad de los cambios p.Arg117Gly y p.Gly119Cys de CNP y de su posible efecto dominante. Estudio de la capacidad de activación de NPR-B, por parte de CNP. Se utilizaron células COS-7 transfectadas con vectores de expresión de NPR-B o el vector vacío (pcDNA3.1), junto con CNP: silvestre (WT), con los cambios p.Arg117Gly (R117G) o p.Gly119Cys (G119C), o con una mezcla de CNP silvestre y cada cambio en una proporción 1:1. La activación de NPR-B se mide a través de su actividad guanilato ciclasa y se representa en % de GMPc respecto a CNP silvestre. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y se hicieron dos réplicas independientes. Las diferencias significativas respecto a las células transfectadas con vectores de expresión de NPR-B y CNP silvestre, aparecen marcadas con asteriscos ($p < 0.01$). Los cambios p.Arg117Gly y p.Gly119Cys no son capaces de activar NPR-B y producen un efecto dominante negativo en heterocigosis.

2.3.3 Caracterización de los niveles de CNP y GMPc en pacientes portadores del cambio c.349C>G.

Estudios previos demostraron que pacientes con displasias esqueléticas, como son la acondroplasia, hipocondroplasia y displasia tanatofórica, presentan niveles elevados de CNP en sangre (Olney et al. 2015). Además, se ha descrito que un paciente con defectos esqueléticos y que es portador de una delección en heterocigosis que incluye al gen *NPPC*, tiene también mayor concentración de CNP en sangre (Tassano et al. 2013). Es posible que pacientes con defectos en *NPPC*, presenten alterados sus niveles de CNP circulante. Para demostrarlo, se analizaron los niveles en sangre del probando 11 y de su madre, ambas con el cambio c.349C>G que afecta a *NPPC*. Se midieron los niveles tanto de la forma final de 22 aminoácidos de CNP (CNP), como de su forma no procesada (NT-proCNP), debido a que la forma final CNP, se encuentra en muy baja concentración en sangre, mientras que NT-proCNP es más abundante y por tanto, más fácil de detectar (Olney et al. 2012). Además se analizaron los niveles de GMPc circulante en ambos individuos. Los resultados mostraron que el probando 11 y su madre muestran unos niveles normales de NT-proCNP, CNP y GMPc (Fig. 43).

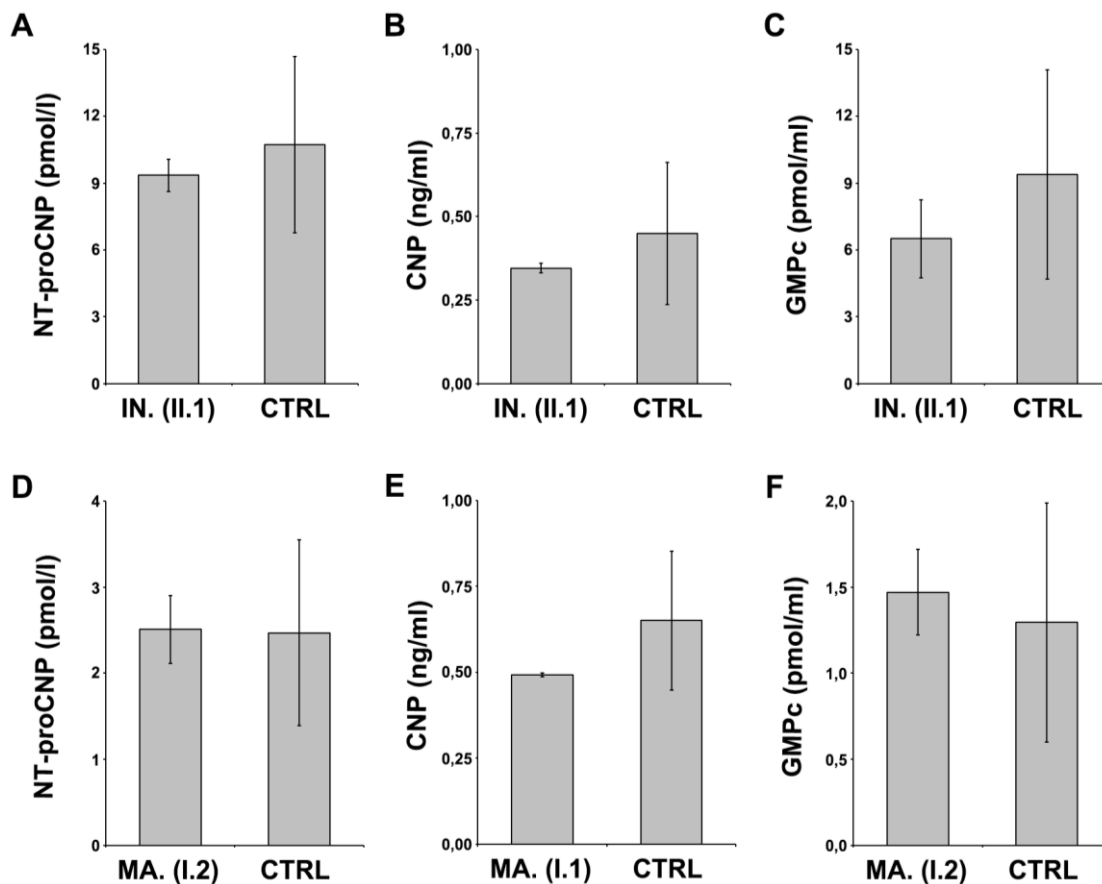


Figura 43. Análisis de los niveles de CNP y GMPc en el plasma sanguíneo de pacientes portadores de la mutación p.Arg117Gly de *NPPC*. Comparación de la concentración de CNP y GMPc en el plasma sanguíneo de la paciente 11 (IN.) y su madre (MA.), ambas portadoras de la mutación p.Arg117Gly de *NPPC*, y de controles sanos (CTRL). Se utilizó la técnica de ELISA y se midió la concentración de la forma pre-procesamiento de CNP (NT-pro CNP), la forma final de 22 aminoácidos (CNP) y GMPc. Los resultados de los pacientes fueron comparados con controles de su misma nacionalidad, sexo y edad, que no presentaban defectos esqueléticos. Se usaron nueve controles en el caso de la paciente 11 y seis en el caso de su madre. Las cantidades de NT-proCNP, CNP y GMPc se muestran en pmol/ml, ng/ml y pmol/ml respectivamente. Los individuos estudiados muestran cantidades normales de NT-proCNP, CNP y GMPc en el plasma sanguíneo.

Discusión

1. Implicación de SHOX y SHOX2 en la regulación de la formación de la matriz extracelular de cartílago.

Estudios previos demostraron que SHOX es capaz de regular la expresión de *Agc1* en colaboración con el trío SOX (Aza-Carmona et al. 2011) y que *Shox* y *Shox2* regulan la expresión de *Agc1* y *Col2a1* (Tiecke et al., 2006 y Bobick et al. 2012). Además, nuestro grupo observó que *COMP*, *MATN1*, *COL2A1* y *S100A1* muestran un aumento de la expresión en células U2OS que sobreexpresan SHOX. Teniendo en cuenta estos datos, propusimos que SHOX y SHOX2 podrían llevar a cabo un papel clave en la regulación de la formación de la MEC de cartílago, regulando la expresión de varias de sus proteínas, ya sea de forma directa o a través del trío SOX.

1.1. Papel llevado a cabo por SHOX en la regulación de la MEC de cartílago.

En esta tesis, hemos demostrado que SHOX activa la expresión de varios genes relacionados con la formación de la MEC de cartílago y la condrogénesis. Hemos observado que SHOX regula de forma directa la expresión de *Matn1*, *Col2a1* y *S100A1* y que también actúan como cofactor, junto al trío SOX, activando la expresión de *Comp*, *Matn1*, *miR-140* y *S100A1*, mediante ensayos de luciferasa en células U2OS. También hemos observado que el homedominio de SHOX juega un papel fundamental en dicha activación, ya que los mutantes localizados en esta región son incapaces de activar la expresión de las dianas estudiadas, con la excepción de p.R153L.

La mutación p.R153L afecta a un aminoácido que no está altamente conservado en vertebrados, y ha sido clasificada como patogénica por los predictores de patogenicidad *in-silico* *SIFT* (0, deletéreo), *Polyphen* (1.00, deletéreo) y *CADD v1.3* (34, patogénico) y como benigno por *Mutation tester* (1, polimorfismo). En cuanto a su funcionalidad, mantiene la capacidad de dimerizar, de unirse al ADN y de unirse a SOX6 (Schneider et al. 2005; Aza-Carmona et al. 2011). También presenta una capacidad similar a la de SHOX silvestre a la hora de activar la expresión de *Agc1* (Aza-Carmona et al. 2011) y, como se ha visto en esta tesis, de *miR-140*. Estos datos pueden llevar a pensar que p.R153L podría ser un polimorfismo, sin embargo, cosegrega con la patología en al menos cuatro familias independientes (Grigelioniene et al. 2000; Niesler et al. 2002; Zinn et al. 2002; Falcinelli et al. 2002; Stuppia et al. 2003).

Observamos que el mutante de SHOX, p.R280P, localizado en el dominio de transactivación, no provoca el mismo efecto en todas las dianas, por ejemplo, muestra valores parecidos a los de SHOX silvestre en el caso de la activación de *Comp*, *S100A1* y *miR-140*, pero muestra una disminución similar al resto de los mutantes en el caso de *Matn1*. Esto puede deberse a que SHOX podría ser capaz de regular la expresión de sus dianas utilizando diferentes mecanismos, por ejemplo, es posible que actúe únicamente como cofactor, facilitando la formación de complejos con otras proteínas que crearán la señal de activación, en este caso el dominio de transactivación sería prescindible, por lo que defectos en él, no provocarían una reducción de la actividad de SHOX. Así se explicarían los resultados obtenidos con *Comp*, *miR-140*, *S100A1*. Por otro lado, puede que SHOX participe en la regulación de estos genes creando por sí mismo una señal de activación a través del dominio de transactivación, así ocurriría con la activación de *Matn1*. Esto concuerda con el hecho de que SHOX tenga dos isoformas: SHOXa,

compuesta por el homeodominio y el dominio de transactivación, y SHOXb, que carece del segundo y, por lo tanto, no tiene capacidad activadora (Rao et al 2001). La isoforma SHOXa podría actuar como cofactor o creando una señal de activación, mientras que SHOXb solo podría actuar como cofactor.

Sorprendentemente, mediante experimentos llevados a cabo en células mesenquimales de ratón C3H/10T1/2, observamos que SHOX es capaz de activar la expresión endógena de *Matn1* exclusivamente, no produciendo ningún efecto en el resto de dianas, *Comp*, *Col2a1*, *miR-140*, *S100a1* y *Agc1*. Lo mismo sucede al incluir el trío SOX, solo se da una activación de la expresión en el caso de *Matn1*, y esta se ve aumentada al añadir a SHOX. Esto puede deberse a varios motivos, uno de ellos puede ser la diferencia entre las técnicas utilizadas. En los ensayos de luciferasa se analiza exclusivamente una región reguladora de la diana en concreto, fuera de su contexto genético, mientras que con la cuantificación de ARNm se estudia el efecto conjunto de todas las regiones que están influyendo en la expresión de dicha diana, entre las que se pueden encontrar además silenciadores de la expresión. Otro motivo puede ser que para que SHOX lleve a cabo su activación, necesite de otros factores específicos de condrocitos. Las células utilizadas en estos experimentos son células mesenquimales indiferenciadas, por lo tanto, puede que no expresen dichos factores. Para descartar este último motivo, se provocó la diferenciación estas células hacia condrocitos, estimulándolas con BMP2, provocando que comenzaran a expresar factores característicos de células condrogénicas, como *Col2a1* y *Sox9*. En estas condiciones se observó que SHOX tampoco fue capaz de activar la expresión de *Comp*, *Col2a1*, *S100a1*, *miR-140* y *Agc1*. Por lo tanto, sólo *Matn1* muestra respuesta a la presencia de SHOX en células C3H/10T1/2.

1.2. Papel llevado a cabo por SHOX2 en la regulación de la MEC de cartílago.

Los resultados obtenidos con SHOX2 en cuanto a la regulación de la expresión en los ensayos de luciferasa con los promotores de los genes de interés son bastante parecidos a los de SHOX. SHOX2 activa la expresión de *Matn1*, *Col2a1* y *S100A1* de forma directa y de *Comp*, *Matn1*, *miR-140*, *S100A1* ayudado por el trío SOX. Sin embargo, SHOX2 no es capaz de activar la expresión endógena de *Matn1* por sí solo, ni junto al trío SOX. Hasta el momento, se ha descrito que SHOX2 es capaz de provocar el mismo efecto que SHOX en dos de sus dianas, *NPPB* y *Agc1* (Aza-Carmona et al. 2014), pero no es capaz de activar *FGFR3* (Decker et al. 2011). Por lo tanto, SHOX y SHOX2 tienen algunas dianas comunes y otras exclusivas de cada uno, dando lugar a que exista competencia entre ambas por la activación de las dianas comunes, en las regiones en las que ambos genes están expresados.

Ambas proteínas presentan patrones de expresión parecidos pero no idénticos en las extremidades en desarrollo (Blashke et al. 1998; Clement-Jones et al. 2000), *SHOX2* se expresa en la región proximal-media y *SHOX* en la región media (Clement-Jones et al. 2000 y Tiecke et al. 2006). El gen *Shox2* se expresa también en corazón y sistema nervioso, entre otros, pero *SHOX* no (Rao et al. 1997, Semina et al. 1998, Blaschke et al. 1998; Tiecke et al. 2006). Esto explica que la ausencia de *SHOX* y *Shox2* de lugar a fenotipos distintos, la falta de *SHOX* cursa con defectos exclusivamente esqueléticos (Shears et al. 2002; Zinn et al. 2002; Campos-Barros et al. 2007), mientras que la de *Shox2* cursa además con defectos

cardiacos (Blaschke et al. 2007; Espinoza-Lewis et al. 2009; Puskaric et al. 2010) y del sistema nervioso (Vickerman et al. 2011; Rosin et al. 2015a,b).

SHOX no tiene ortólogo en roedores, pero *SHOX2* sí, por lo tanto, fuimos capaces de llevar a cabo estudios funcionales de *Shox2* *in vivo* en ratón. Se utilizaron dos modelos de *knock-out* condicionales, *Col2a1-Cre(Shox2)* y *Prrx1-Cre(Shox2)*, en las que *Shox2* está ausente en las extremidades exclusivamente (Cobb et al. 2006; Bobick et al. 2012). Estudios previos, demostraron que *Shox2* es capaz de regular la expresión de *Agc1* y *Col2a1*, dos de las dianas estudiadas en este trabajo, a través de *Bmp2* y *Bmp4* (Bobick et al. 2012), denotando que *Shox2* lleva a cabo distintas funciones según su localización y el estado de desarrollo. Como consecuencia de dicha regulación, *Agc1* y *Col2a1* se mostraban reprimidas en el ratón *Col2a1-Cre (Shox2)* y sobreexpresadas en el *Prrx1-Cre(Shox2)* (Bobick et al. 2012). En esta tesis, analizamos la expresión de otros tres genes característicos de la MEC usando los mismos modelos, y vimos que *Comp* y *miR-140* actúan igual que *Agc1* y *Col2a1*, mientras que *Matn1* no muestra variación en su expresión. Por lo tanto, es posible que *Comp* y *miR-140* estén reguladas por *Shox2* y que esta regulación se haga a través de *Bmp2* y *Bmp4*, mientras que *Matn1* no muestra activación por parte de *Shox2*, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente en este trabajo.

También estudiamos el patrón de expresión de las dianas de interés en extremidades de ratón. *Matn1* y *Agc1* muestran un patrón de expresión homogéneo a lo largo de todo el molde de cartílago, mientras que la expresión de *Comp* se da exclusivamente en los condrocitos hipertróficos y el periostio cercano. Estos datos concuerdan con lo descrito anteriormente para *Comp*, que observaron que su expresión en ratón comienza a los 10 días post coito, en células mesenquimales del embrión. A los 13 días, *Comp* es sintetizado por los condrocitos hipertróficos que darán lugar a los centros de osificación primarios en las extremidades. A los 19 días, *Comp* es expresado mayoritariamente por los condrocitos hipertróficos y en menor medida proliferativos la placa de crecimiento, y en el periostio y pericondrio (Fang et al. 2000; Kong et al. 2007).

Estudios previos observaron que, aunque había diferencias en los niveles de expresión de *Col2a1* en los ratones *Prrx1-Cre(Shox2)* y *Col2a1-Cre (Shox2)*, su patrón de expresión en las extremidades en desarrollo era idéntico al del ratón silvestre (Cobb et al. 2006 y Bobick et al. 2012). En esta tesis, estudiamos el patrón de expresión de *Agc1*, *Matn1* y *Comp* y observamos que *Agc1* y *Matn1* mostraron el mismo patrón tanto en los miembros de ratones silvestre, como en los dos tipos de *knock-out*, mientras que *Comp* presentó diferencias de expresión entre el ratón silvestre y el ratón *Prrx1-Cre(Shox2)*, este último muestra ausencia total de expresión en los condrocitos hipertróficos, pero no en el periostio. Esto se debe probablemente a la ausencia de condrocitos hipertróficos provocada por la falta de *Shox2*.

1.3. Capacidad de SHOX de regular la expresión a través BMP2.

Debido al solapamiento de funciones y la alta homología entre *SHOX* y *SHOX2* (Blaschke et al. 1998; Liu et al. 2011), nos planteamos la posibilidad de que *SHOX* también regulara la expresión de genes relacionados con la MEC de cartílago a través de *BMP2*. Observamos que *SHOX* no es capaz de regular la expresión de *Bmp2* ni *Bmp4*, tanto en células indiferenciadas, como en células condrogénicas. Sin embargo, la presencia de *BMP2* provoca un aumento de la expresión de *Col2a1* y *miR-140*. Por lo

tanto, es posible que Bmp2 active la expresión de *Col2a1* y *miR-140*, pero a través de otras vías, no como consecuencia de la inducción de SHOX. Por ejemplo, se ha hablado previamente de la capacidad de Shox2 de regular la expresión de *Col2a1* a través de *Bmp2* y *Bmp4* (Bobick et al. 2012), y se sabe que la presencia de BMP4 provoca una activación de la expresión de *miR-140* (Liu et al. 2013). Además, se ha visto que *MiR-140* inhibe la expresión de BMP2 (Hwang et al. 2014), existiendo la posibilidad de que entre ambos genes haya un mecanismo regulatorio de retroalimentación negativa.

1.4. Características de la activación del promotor de *MATN1* por parte de SHOX.

Una vez confirmada la capacidad de SHOX de regular la expresión de *Matn1*, intentamos caracterizar el mecanismo subyacente involucrado. En el promotor de *Mant1* se han encontrado varias regiones reguladoras altamente conservadas en amniotas, destacando las regiones *Pe1* e *Ine* (Rentsendorj et al. 2005). Ambas presentan sitios de unión de *Sox5/6* y *Sox9*, componentes del trío SOX (Rentsendorj et al. 2005; Nagy et al. 2011). Confirmamos la capacidad de SHOX de regular directamente el promotor de *Matn1*, ya que la activación de la expresión de *Matn1* por parte de SHOX se mantiene al utilizar los promotores de *Matn1* con mutaciones en *Pe1M1* e *IneM2*, que impiden el correcto reconocimiento por parte del trío SOX (Rentsendorj et al. 2005; Nagy et al. 2011). También analizamos el efecto de dichos mutantes en la activación de la expresión de *Matn1* llevada a cabo por SHOX junto al trío SOX. Observamos que tanto el mutante *Pe1M1* por sí solo como junto con *IneM2* provocan una reducción de dicha activación, sorprendentemente esta reducción no se da al utilizar *IneM2* en solitario, observándose incluso un aumento de la activación. La sobreexpresión por parte del trío SOX del promotor de *Matn1* con la variante *IneM2* ha sido observada previamente utilizando diferentes líneas celulares (Nagy et al. 2011) y puede deberse a que la región *Ine* se encuentra muy próxima al sitio de unión de TBP (*TATA-binding protein*), un factor esencial para la transcripción. La unión del trío SOX a la región *Ine* podría interferir físicamente con el reclutamiento de TBP y, por consiguiente, de la maquinaria de transcripción, dando lugar a una disminución de la expresión de *Matn1*. La mutación *IneM2* impide que el trío SOX se una a *Ine*, que dejaría libre el sitio de unión de TBP, facilitando así su unión y provocando un aumento de la expresión de *Matn1*.

Posteriormente demostramos que la región necesaria para que SHOX active la expresión de *Matn1*, se encuentra en el promotor proximal, entre -478 y +54 pb del inicio de la transcripción. Esta región no contiene ningún elemento palindrómico perfecto o imperfecto (Wilson et al. 1995, Rao et al. 2001; Marchini et al. 2007), pero contiene varias regiones ricas en AT. Estudios previos han demostrado que SHOX puede unirse a regiones ricas en AT sin secuencia concreta (Decker et al. 2011), por lo tanto, se deberá estudiar la capacidad de SHOX de unirse a dichas regiones mediante EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Por otro lado, esta región incluye las regiones altamente conservadas *Pe1* e *Ine*, a las que se une el trío SOX, por lo tanto, existe la posibilidad de que SHOX ejerza su función a través de su unión al trío SOX.

Se buscaron variantes en la región equivalente en humanos a la región mínima necesaria para la activación de la expresión de *MATN1* por parte de SHOX (de -478 a +54 pb) en 242 pacientes con DLW y 96 con TBI. Se encontró un cambio, c.-199C>T, en heterocigosis, en una paciente con

sospecha de DLW. Este cambio no ha sido descrito previamente en la base de datos 1000genomas, ni ha sido observado en 264 individuos españoles de talla normal. Fue imposible determinar su cosegregación debido a la falta de datos de sus parientes. El cambio c.-199C>T se encuentra entre los elementos *Pe1* e *Ine*, en una región con bajo nivel de conservación y con alto contenido en GC, sugiriendo que no es un posible sitio de unión de SHOX. Aun así, demostramos que la variante provoca una reducción de la activación llevada a cabo por SHOX, pero sólo cuando se encuentra junto al trío SOX. Por tanto, es posible que el cambio no afecte directamente a la unión de SHOX, pero sí a la de factores necesarios para que lleve a cabo su activación. Se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de posibles sitios de unión de factores de transcripción en la región mutada y se encontraron tres: SP1 (*Specificity protein 1*), TP53 (*Tumor protein 53*) y PAX5 (*Paired box 5*). SP1 y TP53 tienen expresión ubicua y son parte imprescindible de la maquinaria celular, mientras que PAX5 se expresa exclusivamente en linfocitos, sistema nervioso central y testículos (Adams et al. 1992; Urbanek et al. 1994). Por otro lado, la interacción con dicha secuencia por parte de otros factores sin identificar podría explicar la reducción de la activación del promotor de *Matn1*.

Se ha demostrado que la ausencia de *Matn1*, no da lugar a un fenotipo grave, ya que el ratón *knock-out* de *Matn1* no presenta ninguna anomalía esquelética, ni en la placa de crecimiento (Aszódi et al. 1999; Huang et al. 1999). Existen tres tipos de matrilinas (*Matn1-3*) que se expresan en cartílago. Se cree que llevan a cabo las mismas funciones, ya que los ratones *knock-out* de cada uno de ellos (*Matn1*^{-/-}, *Matn2*^{-/-} y *Matn3*^{-/-}) e incluso el ratón *knock-out* doble de *Matn1* y *Matn3* (*Matn1*^{-/-}/*Matn3*^{-/-}) muestran un desarrollo esquelético normal (Aszódi et al. 1999; Mates et al. 2004; Ko et al. 2004; Nicolae et al. 2007). Esto explicaría porque no se ha establecido una asociación entre *Matn1* y ninguna displasia en humanos. Sin embargo, mutaciones puntuales en *MATN3* se han asociado con la displasia epifisaria múltiple (Chapman et al. 2001; Jackson et al. 2004). Estos defectos provocan la retención, en el retículo endoplasmático (RE), de *MATN3* y de las proteínas con las que interacciona, como por ejemplo las otras proteínas *MATN*, perjudicando su correcta secreción y provocando la apoptosis (Zhang y Chen 2000).

Los datos mostrados anteriormente, junto con el hecho de que no se pudo determinar la cosegregación de la variante c.-199C>T del promotor de *MATN1*, nos llevan a pensar que posiblemente, dicho cambio no es capaz de provocar el efecto suficiente para causar el fenotipo presentado por la paciente por sí solo, pero podría dar lugar a un efecto umbral, en el que la acumulación de varios cambios fuera necesaria para dar lugar al fenotipo. Para confirmar este planteamiento, se deberán continuar con la búsqueda de más cambios en este paciente y sus familiares, usando nuestro panel de displasias esqueléticas SkeletalSeq.V5. También se deberá continuar con la búsqueda de defectos en *MATN1* o sus regiones reguladoras, en nuevos individuos.

1.5. Teorías sobre el papel de SHOX y SHOX2 en la regulación de la expresión de proteínas características de la MEC de cartílago.

El trabajo llevado a cabo en esta tesis ha permitido estudiar la capacidad de SHOX y SHOX2 de regular la expresión de *Col2a1* y *Agc1*, y de descubrir nuevas dianas, como *Comp*, *MATN1* y *miR-140*, demostrando que SHOX y SHOX2 juegan un papel clave en la regulación de la formación de la MEC de cartílago. Defectos en *SHOX*, como los presentes en pacientes con DML, DLW y TBI, podrían causar una reducción de la expresión de estos genes y comprometer la correcta formación de la MEC. Esta teoría podría explicar las diferencias encontradas en las placas de crecimiento de pacientes con DML en las que los condrocitos de la zona de reserva se encuentran más próximos entre sí y los de la zona proliferativa aparecen desorganizados (Barca-Tierno et al. 2011).

Defectos en SHOX son capaces de explicar el ~70% de los casos de DLW, mientras que el ~30% restante no presenta ninguna causa genética asociada. La haploinsuficiencia de COL2A1, AGC1 o COMP se ha asociado con varias displasias esqueléticas con diferentes anomalías del hueso (Bonafe et al. 2015), por lo tanto parece que defectos en estos genes no podrían ser la causa de pacientes con DLW sin defectos en *SHOX*. Sin embargo, defectos en sus regiones reguladoras podrían provocar una disminución de su expresión suficiente para dar lugar a un fenotipo más leve, que podría confundirse con el de pacientes con sospecha de DLW. Los genes *miR-140* y *S100A1* no se han asociado a ninguna patología en humanos, por lo tanto, defectos tanto en sus regiones codificantes, como reguladoras podrían ser la causa del fenotipo presentado por pacientes con DLW sin defectos en *SHOX*. Será necesario analizar las regiones reguladoras de *COL2A1*, *AGC1*, *COMP*, *miR140* y *S100A1* y las regiones codificantes de *miR140* y *S100A1* en un futuro, para confirmar esta hipótesis.

Por último, hemos empezado a descifrar el papel llevado a cabo por SHOX en la regulación de la MEC de cartílago, teniendo como consecuencia la apertura de una nueva línea de investigación que se centrará en profundizar acerca de este tema.

2. Búsqueda de mutaciones en *NPR2* y *NPPC* en pacientes con sospecha de DLW o TBI.

Aproximadamente el 70% de pacientes con DLW y el 2,5% de pacientes con TBI presentan defectos en *SHOX* o sus regiones reguladoras. Se desconoce el defecto molecular causante de la DLW en el 30% restante, y de gran parte de los individuos con TBI. El fenotipo presentado por pacientes con defectos en *SHOX*, ya sea en homo- o heterocigosis, es muy similar al presentado por pacientes con defectos en *NPR2*, por lo tanto, creemos que defectos en los genes de la ruta de señalización de CNP/NPR-B/GMPc pueden ser la causa de la DLW y la TBI, en pacientes sin defectos en *SHOX*.

2.1. Búsqueda de defectos en *NPR2* (receptor del péptido natriurético 2).

2.1.1. Características de los defectos encontrados en *NPR2*.

Llevamos a cabo una búsqueda de mutaciones en 242 pacientes con sospecha de DLW y 96 con TBI, sin defectos en *SHOX* o sus regiones reguladoras. Hemos identificado un total de nueve variantes de *NPR2* en 10 individuos, ocho pertenecen a la cohorte de pacientes con características de DLW y dos a la de TBI. Primero, hicimos un estudio de la patogenicidad de las variantes encontradas mediante herramientas *in silico*, en el que siete de las ocho variantes fueron clasificadas como patogénicas, con la excepción de la variante p.Ala164Gly, que fue clasificada como benigna. Una de las mutaciones encontradas, p.Arg819Cys, había sido descrita previamente en un paciente con TBI, y su patogenicidad había sido previamente demostrada mediante ensayos funcionales (Amano et al. 2013).

Se confirmó la patogenicidad de cinco de las siete variantes restantes de *NPR2*, ya que se observó que cuatro, p.Asp256Tyr, p.Thr421Met, p.Gly643Glu y p.Arg1020Trp, provocan que NPR-B quede retenido en el RE y no logre alcanzar la membrana plasmática, causando una reducción de la actividad guanilato ciclasa debido a defectos en el tráfico celular. Otras dos variantes, p.Val548del y p.Glu991Gly, fueron capaces de alcanzar la membrana plasmática, pero mostraron una reducción de la capacidad de sintetizar GMPc. Estas seis variantes demostraron llevar a cabo un efecto dominante negativo sobre el NPR-B silvestre. Las dos variantes, p.Ala164Gly y p.Asn546Tyr, mostraron localización subcelular en la membrana plasmática y una leve reducción de la actividad guanilato ciclasa cuando fueron transfectadas en solitario, pero no mostraron efecto dominante negativo al ser transfectadas junto con *NPR2* silvestre. Por lo tanto, cuatro de los seis mutantes analizados muestran retención en el RE, esta frecuencia es similar a la mostrada en los estudios de búsqueda de mutaciones en *NPR2* en pacientes con TBI, en los que se vio una frecuencia similar (3/5), pero discrepa con los datos reportados para pacientes con DAMM, en los que la mayoría de las mutaciones causan la retención de NPR-B en el RE (11/12) (Bartels et al. 2004; Vasques et al. 2013; Amano et al. 2014). Curiosamente, el mutante p.Thr421Met se comporta de forma diferente al resto de los mutantes que causan retención en el RE, ya que muestra una reducción del 71% en la actividad guanilato ciclasa, con respecto a NPR-B silvestre, en lugar de mostrar una ausencia total de actividad. Esto puede deberse a que una pequeña proporción del NPR-B mutado, imposible de ver mediante inmunocitoquímica, consigue alcanzar la membrana plasmática y llevar a cabo su función.

A pesar de que la localización subcelular ha sido estudiada únicamente en un total de 22 variantes (Bartels et al. 2004; Vasques et al. 2013; Amano et al. 2014), parece que no existe una correlación entre la localización de la mutación dentro de NPR-B y su habilidad para alcanzar la membrana plasmática, además todas muestran una reducción de la capacidad de sintetizar GMPc. Del mismo modo, tampoco se ha podido establecer una relación entre la localización de las mutaciones y su patogenicidad. Por lo tanto, los estudios funcionales, especialmente el análisis de la capacidad de sintetizar GMPc, son indispensables.

Los estudios de cosegregación demostraron que las variantes p.Asp256Tyr, p.Val548del, p.Gly643Glu, p.Arg819Cys y p.Glu991Gly cosegregan con el fenotipo, mientras que p.Ala164Gly no cosegrega con el fenotipo de talla baja dentro de la familia estudiada, ni en otra familia reportada recientemente, en la que fue clasificada como variante de significado incierto (Wang et al. 2015). La determinación del efecto dominante negativo llevado a cabo en esta tesis, ha sido clave para determinar que esta variante no es patogénica. Por otro lado, p.Asn546Tyr, la otra variante que no es patogénica según los estudios funcionales, fue encontrada en dos pacientes, parece no cosegregar con el fenotipo del paciente 4 y fue imposible determinar su cosegregación en la familia del probando 5 debido a la falta de muestras de los familiares.

La mutación p.Arg819Cys ha sido descrita en dos familias, en este estudio y en un paciente con TBI (Amano et al. 2014). El probando 7 de nuestra cohorte, a la edad de 10 años, presentaba una talla de -2,3 DE, una proporción E/T de 0,95 y de TS/T de 0,54 e hipertrofia muscular, es decir, el paciente presentaba talla baja y acortamiento de las extremidades superiores. Su madre, portadora de la mutación, también tiene talla baja desproporcionada (-3,0 DE), E/T de 0,94 y TS/T de 0,56, que nos indican un acortamiento de las extremidades superiores e inferiores. Mientras tanto, el paciente brasileño, tenía 17 años, presentaba talla baja proporcionada (-2,4 DE y TS/T de +1,3 DE) y acortamiento de los metacarpos, por otro lado, su madre, también con la mutación, presentaba una talla dentro de la normalidad (-1,7 DE) y TS/T de 0,57, lo que sugiere acortamiento de las extremidades inferiores (Amano et al. 2014). Por lo tanto, podemos concluir que las medidas antropométricas son muy variables en pacientes con la mutación p.Arg819Cys, al igual que las observadas en pacientes con defectos en *SHOX* (Shears et al. 1998, Ross et al. 2001, Grigelioniene et al. 2001 y Rappold et al. 2007).

Interesantemente, los probandos 2 y 8 presentaron epífisis en forma de cono, los probandos 8 y 9 acortamiento de las falanges y el probando 8 también presentó frente ancha, todos son rasgos típicos asociados a pacientes con DAMM, es decir con defectos en *NPR2* en homocigosis o heterocigosis compuesta, aunque no tan severos. Además, los probandos 8 y 9 mostraron malposición dentaria, una característica que no ha sido previamente asociada con mutaciones en *NPR2* o *SHOX*, expandiendo así el espectro fenotípico de las características clínicas asociadas a mutaciones en *NPR2*, aunque no se puede descartar la implicación de otros factores.

En contraposición a los resultados descritos hasta la fecha, no hemos encontrado ninguna mutación en *NPR2* en pacientes clasificados con TBI (Vasques et al. 2013; Amano et al. 2014 y Wang et al. 2015). En estos estudios, los pacientes eran clasificados como TBI cuando tenían una talla inferior a -2 DE y sin etiología definida. La utilización de una definición más estricta de la TBI a la hora de

seleccionar los pacientes, como la utilizada por Cohen et al. 2008, que define la TBI como una estatura por debajo de -2 DE con respecto a su edad, grupo poblacional y sexo, en los que no se ha encontrado ningún trastorno sistémico, endocrino, nutricional o cromosómico que lo cause, ha podido propiciar la ausencia de defectos en *NPR2* en nuestra cohorte de TBI. En este trabajo, todos los pacientes en los que se ha encontrado mutaciones de *NPR2* presentan talla baja desproporcionada y/o características clínicas indicadoras de deficiencia de *SHOX*. Esta observación tiene sentido, ya que los pacientes con DAMM, tienen una talla baja desproporcionada severa. Sin embargo, ninguno de los pacientes con mutaciones en *NPR2* presentó la deformidad de Madelung, la característica más notable de los pacientes con DLW, este hecho puede ser de ayuda a la hora de llevar a cabo un diagnóstico diferencial entre pacientes con posibles defectos en *SHOX* o *NPR2*. No obstante, debido a la gran heterogeneidad clínica de los pacientes tanto con defectos en *SHOX*, como en *NPR2*, y a que muchas de esas características clínicas son compartidas, se recomienda la búsqueda sistemática de mutaciones en *NPR2* en pacientes con características de DLW, que no tienen deformidad de Madelung, en los que se han descartado defectos en *SHOX*.

Teniendo en cuentas nuestra experiencia, el mejor abordaje de cara a su diagnóstico consiste en un primer nivel en el que se buscan defectos en *SHOX* o sus regiones reguladoras mediante MLPA y HRM junto con secuenciación Sanger, ya que este gen no puede ser analizado por nuestro panel de displasias esqueléticas (SkeletalSeq.V5) debido a la alta frecuencia de repeticiones Alu o LINE a lo largo del gen y sus regiones flanqueantes. Los casos negativos, pasarán al segundo nivel y serán analizados mediante el panel de displasias esqueléticas SkeletalSeq.V5, que incluye los genes de la vía CNP/NPR-B/GMPc, entre otros.

2.1.2. Capacidad de BNP de activar NPR-B.

Se ha visto que tanto CNP como BNP se unen a NPR-B, pero CNP lo hace con una mayor eficiencia, dando lugar a un mayor incremento de la actividad guanilato ciclasa (Koller et al. 1991; Suga et al. 1992). Esto sugiere, que en condiciones fisiológicas, ambos pueden unirse a NPR-B, dependiendo de su patrón y tiempo de expresión. En esta tesis, hemos demostrado que las mutaciones de NPR-B analizadas, p.Val548del y p.Glu991Gly también son capaces de provocar una reducción de los niveles de GMPc bajo el estímulo de BNP, en lugar de CNP. Por lo tanto, es posible que todas las mutaciones de NPR-B que causen un descenso de los niveles de GMPc en presencia de CNP, puedan causarlo también en presencia de BNP. Los dos péptidos natriuréticos presentan un patrón de expresión diferente, tanto espacial, como temporal (Nishikimi et al. 2011), en cuanto a la placa de crecimiento, CNP se localiza en los condrocitos proliferativos y prehipertróficos (Chusho et al. 2001), mientras que BNP se localiza en los hipertróficos exclusivamente (Marchini et al. 2007). Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que los mutantes de NPR-B también podrían afectar las rutas de señalización de BNP.

2.1.3. Tratamiento con hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH) en pacientes con defectos en *NPR2*.

El tratamiento con rhGH está indicado para pacientes con haploinsuficiencia de *SHOX*, ya que puede mejorar la talla de la mayoría de los individuos en +1,3 DE, que se traduce en un incremento de la estatura de unos 10-15 cm, si el tratamiento empieza en las primeras etapas de la niñez (Blum et al. 2007). Es más, el 57% de los pacientes con defectos en *SHOX* que han sido tratados con rhGH alcanzaron una estatura final dentro de la normalidad (superior a -2 DE) (Blum et al. 2013). Actualmente, no existe ninguna indicación para el tratamiento de pacientes con mutaciones en *NPR2*. Estudios previos llevados a cabo en muy pocos individuos, observaron que el tratamiento con rhGH no provocaba una gran mejora en la talla de estos pacientes (Vasques et al. 2013; Amano et al. 2014; Wang et al. 2015). Sin embargo, en estos casos, el tratamiento empezó tarde, durante la pubertad (Vasques et al. 2013), o fue mantenido durante un corto periodo de tiempo (Amano et al. 2014). En esta tesis, el probando 8, con la mutación p.Glu991Gly en *NPR2*, está siendo tratado con rhGH. Su tratamiento empezó a los 7,9 años y se ha mantenido durante 5 años. Como consecuencia, el probando ha mostrado un incremento en su talla de +1,6 DE. Por otro lado, su hermano, que también tiene la mutación, no ha sido tratado con rhGH y presenta talla baja (-2,3 DE) y retraso severo del crecimiento óseo. Como consecuencia de nuestros estudios, ha sido posible obtener el permiso de uso compasivo del tratamiento con rhGH en el hermano del probando 8.

Actualmente, ninguno de los dos pacientes ha alcanzado la madurez, por lo tanto, el impacto real del tratamiento con rhGH solo podrá ser evaluado cuando alcance su talla final. La gran respuesta inicial al tratamiento observada en el probando 8 sugiere que el tratamiento con rhGH podría ser beneficioso para pacientes con defectos en heterocigosis en *NPR2*, siempre y cuando el tratamiento comience durante su niñez, aunque será necesario llevar a cabo más estudios para confirmarlo.

Recientemente, hemos formado un consorcio internacional con los demás grupos que tienen pacientes con defecto en *NPR2* bajo tratamiento con rhGH, con la intención de aunar nuestro conocimiento del tema y determinar que pacientes deberían tener acceso al dicho tratamiento.

En resumen, se han encontrado seis mutaciones en 242 individuos (2,5%) referidos como posible DLW, la mayoría con talla baja desproporcionada, mientras que no se ha encontrado ninguna en 96 pacientes con TBI. Por lo tanto, se recomienda la búsqueda de defectos en *NPR2* en pacientes referidos como DLW, con talla baja desproporcionada y sin deformidad de Madelung, que no presenten defectos en *SHOX* o sus regiones reguladoras.

2.2 Búsqueda de defectos en *NPPC* (precursor del péptido natriurético tipo C).

Analizamos la posibilidad de que defectos en *NPPC*, que codifica CNP, el ligando de NPR-B, pudieran causar el mismo fenotipo que *NPR2*. Para ello, se realizó una búsqueda de defectos en *NPPC* en 242 pacientes con sospecha de DLW y 96 con TBI y se encontró un cambio, p.Arg117Gly, en una paciente con talla baja y braquidactilia. Analizamos su cosegregación con el fenotipo y observamos que la

variante cosegrega con el fenotipo a lo largo de tres generaciones. Esta variante no ha sido descrita previamente y no está presente en controles españoles, ni europeos.

Aunque es la primera vez que se encuentra una mutación en *NPPC* en humanos, el ratón *long bone abnormality (lbab)* presenta el mismo cambio de forma espontánea (Jiao et al. 2007). Dicho ratón (*lbab/lbab*) se caracteriza por tener enanismo debido al acortamiento de los huesos largos y estrechamiento de la placa de crecimiento, especialmente en las zonas proliferativa e hipertrófica (Tsuji et al. 2008; Kondo et al. 2012). En estos trabajos, se afirma que no existen diferencias apreciables entre el ratón silvestre y con la mutación p.Arg117Gly en heterocigosis (+/*lbab*), para afirmar esto se centran en la distancia naso-anal de los ratones, que sería un equivalente a la talla sentado de un individuo, es decir, no tiene en cuenta las extremidades inferiores (Kondo et al. 2012). El fenotipo de nuestros pacientes se caracteriza por presentar un fenotipo leve, caracterizado por talla baja con acortamiento de las extremidades y de las manos y los pies. Parece que los ratones +/*lbab*, presentan también un cierto acortamiento de las extremidades, pero sin reducción del tamaño de su tronco (Kondo et al. 2012). Además, comparando las placas de crecimiento, vemos que los ratones +/*lbab* muestran una reducción intermedia del tamaño de su zona hipertrófica, siendo ésta mucho más reducido en el ratón *lbab/lbab* (Kondo et al. 2012). Algo similar ocurre con *NPR2*, el ratón con defectos en heterocigosis en este gen, es muy similar al silvestre (Tamura et al. 2004; Sogawa et al. 2007), pero en humanos, da lugar a un fenotipo leve, que cursa talla baja desproporcionada, mientras que la ausencia total de *NPR2* provoca un fenotipo severo de enanismo en ambas especies (Bartels et al. 2004; Sogawa et al. 2012).

Posteriormente, el grupo colaborador del Dr. Alexander Jorge, Universidad de Sao Paulo, Brasil, encontró otro cambio en *NPPC*, p.Gly119Cys, en un paciente con TBI y en su padre, con el mismo fenotipo. Esta variante tampoco ha sido descrita previamente. Se llevó a cabo un estudio de su patogenicidad usando herramientas *in silico*, en el que las dos variantes encontradas, p.Arg117Gly y p.Gly119Cys, fueron clasificadas como patogénicas. Su patogenicidad fue confirmada mediante ensayos funcionales, ya que se observó que las dos variantes de CNP no son capaces de activar NPR-B, su receptor. También se demostró su efecto dominante negativo, ya que, cuando se sobreexpresan junto con CNP silvestre, se produce una reducción de la activación de NPR-B.

Parece que la talla baja es el fenotipo característico asociado a la haploinsuficiencia de *NPPC*. El gen *NPPC* se ha incluido en nuestro panel de secuenciación masiva de displasias esqueléticas (SKELETALSEQ.V4, 327 genes), con la intención continuar con la búsqueda de defectos en *NPPC* que nos ayuden a acotar su fenotipo asociado. Resulta interesante que este fenotipo sea muy similar al descrito en este estudio para defectos en heterocigosis de *NPR2*, ya que *NPPC* y *NPR2* participan en la misma vía de señalización (Koller et al. 1991; Suga et al. 1992). La levedad del fenotipo presentado por pacientes con defectos en *NPPC* permite que estos pasen desapercibidos y podría explicar porque no se han encontrado pacientes con defectos en este gen hasta la fecha.

Los cambios encontrados afectan a la estructura básica con forma de anillo de CNP, que está altamente conservada en los tres péptidos natriuréticos, ANP, BNP y CNP (Potter et al. 2006). En el caso de p.Arg117Gly, se cree que la presencia de una glicina en la posición 117 da a CNP mayor flexibilidad conformacional, lo que impide la interacción entre la Asp176 y la Glu77 de NPR-B. Los tres aminoácidos

implicados están altamente conservados indicando la importancia de dicha interacción. Por lo tanto, la ruptura de estos puntos de contacto podría reducir la unión entre CNP y NPR-B (Yoder et al. 2008).

Hasta ahora, los únicos defectos de *NPPC* descritos consistían en reordenamientos cromosómicos (Bocciardi et al. 2007) o grandes deleciones (Tassano et al. 2013), estos causaban sobreexpresión de *NPPC* y altos niveles de CNP en sangre, denotando un mecanismo de compensación de la función (Tassano et al. 2013). Además, se ha descrito que pacientes con defectos en *NPR2* (DAMM) o otras displasias esqueléticas como acondroplasia, hipocondroplasia y displasia tanatofórica presentan niveles elevados de CNP y NT-proCNP (Olney et al. 2006; 2015). En nuestro caso, tanto la madre como la hija con la mutación p.Arg117Gly muestran niveles normales de CNP y NT-proCNP en sangre, comparado con controles de la misma edad, sexo y grado de pubertad. Es posible que el fenotipo observado en estos pacientes, sea independiente de los niveles circulantes de CNP, ya que estos son muy bajos, y se deba exclusivamente a un efecto local, es decir, del CNP sintetizado en los condrocitos y la placa de crecimiento, ya que la sobreexpresión local de CNP, revierte el fenotipo provocado por el cambio p.Arg117Gly en ratones (Kondo et al. 2012).

Se ha demostrado que este tratamiento rescata el fenotipo de acondroplasia en ratones con defectos en *FGFR3* en ensayos clínicos de fase I (Lorget et al. 2012). Actualmente, se están llevando a cabo ensayos clínicos fase II, en los se evalúa el tratamiento con rhCNP (CNP recombinante humano, BMN-111) de pacientes con acondroplasia (www.clinicaltrials.gov, Identificador: NCT02055157, Biomarin), mostrando buenos resultados respecto al crecimiento y otras características clínicas asociadas a esta displasia. Por lo tanto, el tratamiento con rhCNP podría ser una alternativa eficaz para los pacientes con defectos en *NPPC*.

En este trabajo, hemos encontrado la causa genética de 8/242 (3%) de los pacientes con talla baja desproporcionada y braquidactilia, con una diagnosis diferencial de DLW. Estas mutaciones afectan a dos genes, *NPPC* y *NPR2*, que forman parte de la misma vía de señalización. Esta es la primera vez que se han descrito mutaciones de cambio de sentido en *NPPC* y se ha establecido una relación directa entre *NPPC* y un fenotipo concreto en humanos, el de talla baja.

2.3. Teorías sobre la relación entre SHOX y la vía CNP/NPR-B/GMPc.

El solapamiento en el fenotipo mostrado por pacientes con mutaciones en *NPR2*, *NPPC* y *SHOX*, podría indicar un solapamiento de funciones de las vías de acción de cada gen. Sabemos que *SHOX* regula la expresión de *NPPB* y *FGFR3* (Marchini et al. 2007 y Decker et al. 2011) y que ambos genes están relacionados con la vía CNP/NPRB/GMPc (Fig. 44).

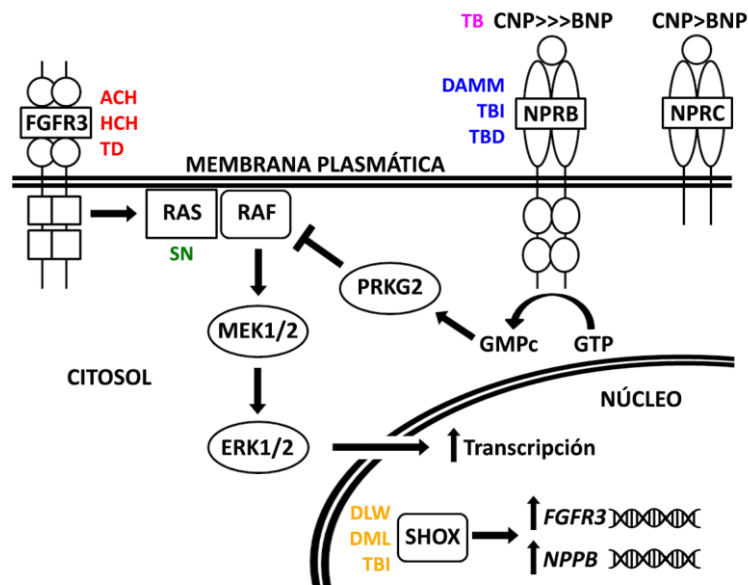


Figura 44. Esquema de la interacción entre las vías de señalización de SHOX y CNP/NPR-B/GMPc. SHOX regula la expresión de FGFR3 y BNP, que a su vez se une a NPRB, compitiendo con CNP. La ruta de señalización de NPR-B inhibe la de FGFR3 a través de PRKG2. En rojo aparecen los síndromes asociados a defectos en *FGFR3* (acondroplasia (ACH), hipocondroplasia (HCH) y displasia tanatofórica (TD)) en verde *RAS* (síndrome de Noonan (SN)), en rosa a *NPPC* (talla baja), en azul a *NPR2* (displasia acromesomélica de tipo Maroteaux (DAMM), talla baja idiopática (TBI) y talla baja desproporcionada (TBD)) y en naranja a *SHOX* (displasia mesomélica de Langer (DML), discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) y TBI) (Bonafe et al. 2015).

SHOX activa el promotor de *NPPB*, causando un incremento de BNP (Marchini et al. 2007). BNP puede unirse a NPR-B y activarlo, modificando su capacidad de sintetizar GMPc. Además, del mismo modo que SHOX, CNP activa la síntesis de Col2a1 y Agc1 y regula el paso de condrocitos proliferativos a hipertróficos, mediado por NPR-B (Peake et al. 2014). También, se ha descrito que SHOX es capaz de activar la transcripción de *FGFR3* en células humanas y de reprimirla en cultivos de micromasa de extremidades de pollo (Decker et al. 2011).

La presencia de CNP activa NPRB, aumentando la síntesis de GMPc a partir de GTP, esto activa varias proteína quinasas, entre ellas, PRKG2, que inhibe RAF, un componente la vía de señalización intracelular de FGFR3 (Geister et al. 2013). Por otro lado, BNP podría competir con CNP por la unión a NPR-B, pero con una eficiencia 20 veces menor. CNP y BNP, también podrían competir por su unión NPR-C con una afinidad más similar. NPR-C es otro receptor de la familia de NPR-B, pero que carece de dominio guanilato ciclase, su función principal consiste en unirse al ligando y retirarlo del medio extracelular (Bennett et al. 1991 y Suga et al. 1992). Mutaciones en heterocigosis en *SHOX* provocarían una disminución de la cantidad de BNP, que no se uniría a NPR-C, por lo que quedara libre para interaccionar con CNP del MEC y secuestrarlo, se produciría una reducción de la cantidad de CNP disponible para unirse a NPR-B, dando lugar a una reducción de su señalización intracelular, parecida a la mostrada por pacientes con defectos en *NPR2* o *NPPC*. Por otro lado, se han encontrado indicios que determinan que *SHOX* podría regular la expresión de *NPPC*, ya que se ha visto que pacientes con síndrome de Klinefelter (XXY), que tiene tres copias funcionales de *SHOX* presentan niveles elevados de CNP en sangre (Olney et al. 2012).

El descubrimiento de nuevos genes relacionados con *SHOX* ampliaría el conocimiento que tenemos de sus patologías asociadas y podría dar lugar al descubrimiento de nuevas alternativas de tratamiento. Además, existe la posibilidad de que defectos en otros genes implicados en la misma vía sean también la causa del fenotipo observado, como por ejemplo, *NPPB*, que codifica para BNP, otro ligando de NPR-B y NPR-C, y *PRKG2* que codifica para una proteína quinasa que se activa en función de NPR-B.

Conclusiones

1. Hemos demostrado que SHOX y SHOX2 juegan un papel importante en la regulación de la MEC de cartílago a través de la regulación de la expresión de *Matn1*, *Comp*, *miR-140* y *S100A1*, mediante ensayos de luciferasa en células U2OS. Por otro lado, hemos observado que SHOX es capaz de regular la expresión endógena de *Matn1* exclusivamente, en células 10T1/2. Las disparidad entre los resultados observados pueden deberse a las diferentes líneas celulares o técnicas utilizadas. Estos hallazgos han contribuido a abrir una nueva línea de investigación que permitirá aumentar el conocimiento acerca de SHOX y sus patologías, incluyendo el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.
2. Mediante el estudio de dos modelos de ratones *knock-out*, hemos demostrado que la ausencia de *Shox2* provoca una disminución de la expresión de *Comp in vivo*, debido probablemente a la falta de condrocitos hipertróficos. Por otro lado, *Agc1* y *Matn1* no muestran diferencias obvias en su expresión.
3. Al contrario que *Shox2*, SHOX no es capaz de regular la expresión de los genes que codifican proteínas características de la MEC de cartílago a través de BMP, pero sí existe la posibilidad de que BMP2 regule la expresión de *miR-140* y *S100a1* durante la condrogénesis, a través de un mecanismo independiente de SHOX.
4. SHOX regula la expresión de *Matn1*, tanto de forma directa, como a través del trío SOX. Hemos delimitado la región necesaria para que se de dicha activación se encuentra en el promotor proximal de *Matn1*, entre -478 y +54 pb del inicio de la transcripción. Además, hemos encontrado una variante en dicha región, c.-199C>T, en una paciente con sospecha de DLW y hemos demostrado que la presencia del cambio reduce la activación del promotor de *MATN1*.
5. La identificación de mutaciones en el gen *NPR2* en aproximadamente 3% de los individuos con sospecha de DLW y su ausencia en pacientes con TBI, ambos sin mutaciones en *SHOX*, nos ha llevado a concluir que mutaciones en dicho gen causan talla baja desproporcionada y pueden ser una diagnosis diferencial de DLW. La determinación del efecto dominante negativo mediante estudios funcionales de los cambios encontrados ha sido clave para determinar su patogenicidad.
6. Al igual que con *SHOX*, los pacientes con defectos en *NPR2* presentan gran variabilidad fenotípica, pero ninguno tiene la deformidad de Madelung. Por lo tanto, recomendamos la búsqueda sistemática de defectos en *NPR2* en pacientes con características de DLW, que no presenten dicha deformidad y sin defectos en *SHOX*.
7. El paciente con la mutación p.Glu991Gly en *NPR2*, está siendo tratado con hormona de crecimiento (rhGH), mostrando un incremento en su talla de +1,6 DE. Hemos observado que, en contra de publicaciones previas, el tratamiento con rhGH es efectivo siempre que este empiece pronto, en la

niñez, y se mantenga durante toda la pubertad. La formación de un consorcio que asesore en la respuesta de tratamiento con rhGH en más pacientes con mutaciones en heterocigosis en *NPR2* ayudará mejorar su eficacia.

8. Hemos encontrado un nuevo gen implicado en talla baja humana, *NPPC*, mediante la identificación de las mutaciones, p.Arg117Gly y p.Gly119Cys en dos familias con talla baja proporcionada y manos pequeñas. Además hemos demostrado que ambas mutaciones reducen la capacidad de sintetizar GMPc al estar en heterocigosis y la anulan completamente en homocigosis.
9. Creemos que el tratamiento con CNP recombinante humano (rhCNP), actualmente investigándose como tratamiento para la acondroplasia, podría ser beneficioso para pacientes con defectos en *NPPC*.
10. Por último, hemos establecido una relación, tanto fisiológica como fenotípica, entre SHOX y las vías de señalización de FGFR3 y de CNP/NPR-B/GMPc, que son dos de las vías más importantes en la regulación del crecimiento. Lo que nos ha permitido aumentar el conocimiento acerca de los mecanismos que regulan este proceso de gran complejidad.

Conclusions

1. Using luciferase assays in U2OS cells, we have demonstrated that SHOX and SHOX2 play an important role in the regulation of cartilage ECM through the regulation of *Matn1*, *Comp*, *miR-140* and *S100A1* expression. We have also identified that SHOX is able to regulate *Matn1* endogenous expression but not the other transcription targets in 10T1/2 cells. The differences observed could be due to the different cell lines or techniques employed. These findings have contributed to open a new research line that will increase the knowledge about SHOX and its pathologies, including the detection of new therapeutic targets.
2. We have demonstrated, using two *Shox2* knockout mouse models, that the lack of *Shox2* decreases *Comp* *in vivo* expression, probably due to the absence of hypertrophic chondrocytes. However, *Agc1* and *Matn1* showed no obvious differences.
3. Unlike *Shox2*, SHOX is unable to regulate the expression of genes implicated in the cartilage ECM through BMP2. However, BMP2 could regulate the expression of *miR-140* and *S100A1* during chondrogenesis, but through a SHOX independent manner.
4. SHOX regulates *Matn1* expression directly and indirectly, by cooperating with the SOX trio. We have identified the minimal region of the *Matn1* proximal promoter required for this activation, between -478 y +54 bp from the transcription initiation site. In addition, we have identified a variant (c.-199C>T) in this region, in a patient with suspected LWD and we subsequently demonstrated that this variant reduces *MATN1* promoter activation.
5. We have identified *NPR2* mutations in ~3% of patients with suspected LWD, and none in patients with ISS, both without *SHOX* defects. This lead us to conclude that *NPR2* mutations are a cause of disproportionate short stature, becoming a differential diagnose for LWD. Testing the dominant effect of these variants has been critical for the assessment of their pathogenicity.
6. As with individuals with *SHOX* alterations, patients with *NPR2* mutations show high phenotypic variability, but none of them have presented with Madelung deformity. Therefore, we recommend the systematic search for *NPR2* mutations in patients suspected to have LWD but that do not have Madelung deformity and that have screened negative for *SHOX* alterations.
7. The patient with the p.Glu991Gly *NPR2* mutation, is currently being treated with growth hormone (rhGH), showing an increase in her height of +1.6 SDS. Thus, in contrast with previous publications, it appears that rhGH may be effective if the treatment is started early in the childhood and maintained during all the puberty. The creation of a consortium for the assessment of rhGH treatment response in patients with *NPR2* heterozygous defects will help to determine this in larger numbers.

8. We have determined that *NPPC* is a novel short stature gene, through the identification of the missense mutations, p.Arg117Gly and p.Gly119Cys, in two families with proportionate short stature and small hands. We have gone on to demonstrate that both mutations reduce the ability to synthesize cGMP in heterozygosity and totally deplete it in homozygosity.
9. Human recombinant CNP (rhCNP) treatment is currently under research as a treatment for achondroplasia. This treatment could be also beneficial for patients with NPPC defects.
10. Finally, we have established a relationship, both physiologic and phenotypic, between SHOX and FGFR3 and CNP/NPR-B/GMPc signaling pathways that are two of the most important pathways involved in growth regulation. This has allowed us increase the knowledge of the mechanisms that regulate this very complex process.

Referencias

- Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. 2000. The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 85(2):883-889.
- Adams B, Dorfler P, Aguzzi A, Kozmik Z, Urbanek P, Maurer-Fogy I, Busslinger M. 1992. Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* 6(9):1589-1607.
- Agoston H, Khan S, James CG, Gillespie JR, Serra R, Stanton LA, Beier F. 2007. C-type natriuretic peptide regulates endochondral bone growth through p38 MAP kinase-dependent and -independent pathways. *BMC Dev Biol* 7:18.
- Akiyama H. 2011. Transcriptional regulation in chondrogenesis by Sox9. *Clin Calc* 21(6):845-851.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16(21):2813-2828.
- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR and others. 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18(9):1072-1087.
- Allen DB, Mullen M, Mullen B. 1994. A meta-analysis of the effect of oral and inhaled corticosteroids on growth. *J Allergy Clin Immunol* 93(6):967-976.
- Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, Hasegawa T. 2014. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 99(4):E713-718.
- Amselem S, Duquesnoy P, Attree O, Novelli G, Bousnina S, Postel-Vinay MC, Goossens M. 1989. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 321(15):989-995.
- An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J. 2010. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng* 38(4):1647-1654.
- Aszodi A, Bateman JF, Hirsch E, Baranyi M, Hunziker EB, Hauser N, Bosze Z, Fassler R. 1999. Normal skeletal development of mice lacking matrilin 1: redundant function of matrilins in cartilage? *Mol Cell Biol* 19(11):7841-7845.
- Aza-Carmona M, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchon A, Gorbenko-del Blanco D, Rodriguez JI, Benito-Sanz S, Campos-Barros A, Heath KE. 2014. NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development. *PloS one* 9(1):e83104.
- Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchon A, Benito-Sanz S, Rodriguez JI, Argente J, Campos-Barros A and others. 2011. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* 20(8):1547-1559.
- Ballock RT, O'Keefe RJ. 2003. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2):123-143.
- Barca-Tierno V, Aza-Carmona M, Barroso E, Heine-Suner D, Azmanov D, Rosell J, Ezquieta B, Montane LS, Vendrell T, Cruz J and others. 2011. Identification of a Gypsy SHOX mutation

- (p.A170P) in Leri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia. *Eur J Hum Genet*: 19(12):1218-1225.
- Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI and others. 2004. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet* 75(1):27-34.
- Baumert U, Golan I, Redlich M, Akin JJ, Muessig D. 2005. Cleidocranial dysplasia: molecular genetic analysis and phenotypic-based description of a Middle European patient group. *Am J Med Genet Part A* 139A(2):78-85.
- Beiser KU, Glaser A, Kleinschmidt K, Scholl I, Roth R, Li L, Gretz N, Meckersheimer G, Karperien M, Marchini A and others. 2014. Identification of novel SHOX target genes in the developing limb using a transgenic mouse model. *PloS one* 9(6):e98543.
- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. 1998. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19(1):67-69.
- Benazet JD, Zeller R. 2009. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(4):a001339.
- Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suner D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, Rosell J, Aragonés A, Caimari M, Argente J, Ross JL and others. 2011. Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab* 96(2):E404-412.
- Benito-Sanz S, del Blanco DG, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, Argente J, Campos-Barros A, Heath KE. 2006a. PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat* 27(10):1062.
- Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, Bunyan D, Maloney V, Argente J, Cormier-Daire V, Campos-Barros A and others. 2006b. Characterization of SHOX deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet* 79(2):409-414; author reply 414.
- Benito-Sanz S, Royo JL, Barroso E, Paumard-Hernandez B, Barreda-Bonis AC, Liu P, Gracia R, Lupski JR, Campos-Barros A, Gomez-Skarmeta JL and others. 2012. Identification of the first recurrent PAR1 deletion in Leri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel SHOX enhancer. *J Med Genet* 49(7):442-450.
- Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barros A and others. 2005. A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 77(4):533-544.
- Bennett BD, Bennett GL, Vitangcol RV, Jewett JR, Burnier J, Henzel W, Lowe DG. 1991. Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. *Hormone*

- pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem* 266(34):23060-23067.
- Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 2001. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(12):6698-6703.
- Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, Just S, Wisse LJ, Deissler K, Maxelon T, Anastassiadis K, Spitzer J, Hardt SE and others. 2007. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation* 115(14):1830-1838.
- Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, Padilla-Nash H, Ried T, Rappold GA. 1998. SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5):2406-2411.
- Blum WF, Crowe BJ, Quigley CA, Jung H, Cao D, Ross JL, Braun L, Rappold G, Group SS. 2007. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab* 92(1):219-228.
- Blum WF, Ross JL, Zimmermann AG, Quigley CA, Child CJ, Kalifa G, Deal C, Drop SL, Rappold G, Cutler GB, Jr. 2013. GH treatment to final height produces similar height gains in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome: results of a multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab* 98(8):E1383-1392.
- Bobick BE, Cobb J. 2012. Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *J Cell Sci* 125(Pt 24):6071-6083.
- Bocciardi R, Giorda R, Buttgerit J, Gimelli S, Divizia MT, Beri S, Garofalo S, Tavella S, Lerone M, Zuffardi O and others. 2007. Overexpression of the C-type natriuretic peptide (CNP) is associated with overgrowth and bone anomalies in an individual with balanced t(2;7) translocation. *Hum Mutat* 28(7):724-731.
- Bochukova E, Schoenmakers N, Agostini M, Schoenmakers E, Rajanayagam O, Keogh JM, Henning E, Reinemund J, Gevers E, Sarri M and others. 2012. A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *N Eng J Med* 366(3):243-249.
- Boersma B, Otten BJ, Stoelinga GB, Wit JM. 1996. Catch-up growth after prolonged hypothyroidism. *Eur J Ped* 155(5):362-367.
- Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Sangiorgi L, Savarirayan R, Sillence D and others. 2015. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet Part A* 167(12):2869-2892.
- Borrelli P, Fasanelli S, Marini R. 1983. Acromesomelic dwarfism in a child with an interesting family history. *Ped radiol* 13(3):165-168.
- Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, Dave A, Szumilo M, Solecki M, Klepacz R and others. 2009. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 47(1):5-16.

- Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE. 2007. Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am J Med Genet Part A* 143A(9):933-938.
- Carrascosa A, Fernandez JM, Fernandez C, Ferrandez A, Lopez-Siguero JP, Sanchez E, Sobradillo B, Yeste D. 2008. Spanish growth studies 2008. New anthropometric standards. *Endocrinologia y nutricion: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion* 55(10):484-506.
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T and others. 2000. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9(5):695-702.
- Cobb J, Dierich A, Huss-Garcia Y, Duboule D. 2006. A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(12):4511-4515.
- Cohen-Barak O, Hagiwara N, Arlt MF, Horton JP, Brilliant MH. 2001. Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene. *Gene* 265(1-2):157-164.
- Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM, participants ISSCW. 2008. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):4210-4217.
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. 1996. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12(4):390-397.
- Cucchiari M, Ekici M, Schetting S, Kohn D, Madry H. 2011. Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 17(15-16):1921-1933.
- Cunningham ML, Seto ML, Ratisoontorn C, Heike CL, Hing AV. 2007. Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. *Orthod Craniofac Res* 10(2):67-81.
- Chagin AS, Savendahl L. 2007. GPR30 estrogen receptor expression in the growth plate declines as puberty progresses. *J Clin Endocrinol Metab* 92(12):4873-4877.
- Chapman KL, Mortier GR, Chapman K, Loughlin J, Grant ME, Briggs MD. 2001. Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia. *Nat Genet* 28(4):393-396.
- Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Roth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, Rappold G. 2009. Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* 46(12):834-839.
- Chen L, Li C, Qiao W, Xu X, Deng C. 2001. A Ser(365)-->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum Mol Genet* 10(5):457-465.

- Chrisman TD, Garbers DL. 1999. Reciprocal antagonism coordinates C-type natriuretic peptide and mitogen-signaling pathways in fibroblasts. *J Biol Chem* 274(7):4293-4299.
- Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y and others. 2001. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(7):4016-4021.
- Daughaday WH. 2000. Growth hormone axis overview--somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 14(7):537-540.
- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8(5):739-750.
- de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. 2001. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13(6):721-727.
- De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V, Baron J. 2001. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 142(1):430-436.
- Decker E, Durand C, Bender S, Rodelsperger C, Glaser A, Hecht J, Schneider KU, Rappold G. 2011. FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet* 20(8):1524-1535.
- del Marco A. 1981. Observations of growth plate development in achondroplastic (cn/cn) mice. *Reprod Nutr Dev* 21(6A):1025-1031.
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84(6):911-921.
- Dentice M, Bandyopadhyay A, Gereben B, Callebaut I, Christoffolete MA, Kim BW, Nissim S, Mornon JP, Zavacki AM, Zeold A and others. 2005. The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nat Cell Biol* 7(7):698-705.
- Ding M, Lu Y, Abbassi S, Li F, Li X, Song Y, Geoffroy V, Im HJ, Zheng Q. 2012. Targeting Runx2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development. *J Cell Physiol* 227(10):3446-3456.
- Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. 1997. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 6(8):1341-1347.
- Enomoto H, Komori T. 2001. [Osteoblast differentiation and a transcriptional factor, Cbfa1]. *Clin Calc* 11(4):455-457.
- Espinoza-Lewis RA, Yu L, He F, Liu H, Tang R, Shi J, Sun X, Martin JF, Wang D, Yang J and others. 2009. Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Dev Biol* 327(2):376-385.
- Estrada K, Krawczak M, Schreiber S, van Duijn K, Stolk L, van Meurs JB, Liu F, Penninx BW, Smit JH, Vogelzangs N and others. 2009. A genome-wide association study of northwestern Europeans

- involves the C-type natriuretic peptide signaling pathway in the etiology of human height variation. *Hum Mol Genet* 18(18):3516-3524.
- Falcinelli C, Iughetti L, Percesepe A, Calabrese G, Chiarelli F, Cisternino M, De Sanctis L, Pucarelli I, Radetti G, Wasniewska M and others. 2002. SHOX point mutations and deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Med Genet* 39(6):E33.
- Fang C, Carlson CS, Leslie MP, Tulli H, Stolerma E, Perris R, Ni L, Di Cesare PE. 2000. Molecular cloning, sequencing, and tissue and developmental expression of mouse cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *J Orthop Res* 18(4):593-603.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN and others. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372(6506):525-530.
- Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y. 2010. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol* 224(2):305-310.
- Fujii T, Komatsu Y, Yasoda A, Kondo E, Yoshioka T, Nambu T, Kanamoto N, Miura M, Tamura N, Arai H and others. 2010. Circulating C-type natriuretic peptide (CNP) rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death. *Endocrinology* 151(9):4381-4388.
- Gafni RI, Weise M, Robrecht DT, Meyers JL, Barnes KM, De-Levi S, Baron J. 2001. Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatr Res* 50(5):618-623.
- Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, Yang X, Guo S, Feng G, He L. 2001. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet* 28(4):386-388.
- Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, Zhao B, Peng J, Wang A, Wang Y and others. 2014. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int* 2014:648459.
- Geister KA, Brinkmeier ML, Hsieh M, Faust SM, Karolyi IJ, Perosky JE, Kozloff KM, Conti M, Camper SA. 2013. A novel loss-of-function mutation in Npr2 clarifies primary role in female reproduction and reveals a potential therapy for acromesomelic dysplasia, Maroteaux type. *Hum Mol Genet* 22(2):345-357.
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5(6):623-628.
- Goldring MB, Marcu KB. 2012. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 18(2):109-118.
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. 2006. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97(1):33-44.
- Govoni KE, Lee SK, Chung YS, Behringer RR, Wergedal JE, Baylink DJ, Mohan S. 2007. Disruption of insulin-like growth factor-I expression in type II α collagen-expressing cells reduces bone length and width in mice. *Physiol Gen* 30(3):354-362.

- Grigelioniene G, Eklof O, Ivarsson SA, Westphal O, Neumeyer L, Kedra D, Dumanski J, Hagenas L. 2000. Mutations in short stature homeobox containing gene (SHOX) in dyschondrosteosis but not in hypochondroplasia. *Hum genet* 107(2):145-149.
- Grigelioniene G, Schoumans J, Neumeyer L, Ivarsson A, Eklof O, Enkvist O, Tordai P, Fosdal I, Myhre AG, Westphal O and others. 2001. Analysis of short stature homeobox-containing gene (SHOX) and auxological phenotype in dyschondrosteosis and isolated Madelung deformity. *Hum Genet* 109(5):551-558.
- Grumbach MM. 2000. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: J Ped Endocrinol Metab* 13 Suppl 6:1439-1455.
- Gudbjartsson DF, Walters GB, Thorleifsson G, Stefansson H, Halldorsson BV, Zusmanovich P, Sulem P, Thorlacius S, Gylfason A, Steinberg S and others. 2008. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet* 40(5):609-615.
- Hachiya R, Ohashi Y, Kamei Y, Suganami T, Mochizuki H, Mitsui N, Saitoh M, Sakuragi M, Nishimura G, Ohashi H and others. 2007. Intact kinase homology domain of natriuretic peptide receptor-B is essential for skeletal development. *J Clin Endocrinol Metab* 92(10):4009-4014.
- Hagiwara H, Sakaguchi H, Itakura M, Yoshimoto T, Furuya M, Tanaka S, Hirose S. 1994. Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B. *J Biol Chem* 269(14):10729-10733.
- Han Y, Lefebvre V. 2008. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* 28(16):4999-5013.
- Hannema SE, van Duyvenvoorde HA, Premisler T, Yang RB, Mueller TD, Gassner B, Oberwinkler H, Roelfsema F, Santen GW, Prickett T and others. 2013. An activating mutation in the kinase homology domain of the natriuretic peptide receptor-2 causes extremely tall stature without skeletal deformities. *J Clin Endocrinol Metab* 98(12):E1988-1998.
- He L, Serrano C, Niphadkar N, Shobnam N, Hristova K. 2012. Effect of the G375C and G346E achondroplasia mutations on FGFR3 activation. *PloS one* 7(4):e34808.
- Hecht JT, Montufar-Solis D, Decker G, Lawler J, Daniels K, Duke PJ. 1998. Retention of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and cell death in redifferentiated pseudoachondroplasia chondrocytes. *Matrix Biol* 17(8-9):625-633.
- Helleman J, Coucke PJ, Giedion A, De Paepe A, Kramer P, Beemer F, Mortier GR. 2003. Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet* 72(4):1040-1046.
- Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. 2005. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8(5):727-738.
- Hinoi E, Bialek P, Chen YT, Rached MT, Groner Y, Behringer RR, Ornitz DM, Karsenty G. 2006. Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium. *Genes Dev* 20(21):2937-2942.

- Hirschfeldova K, Solc R, Baxova A, Zapletalova J, Kebrdlova V, Gaillyova R, Prasilova S, Soukalova J, Mihalova R, Lnenicka P and others. 2012. SHOX gene defects and selected dysmorphic signs in patients of idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Gene* 491(2):123-127.
- Hoffman LM, Garcha K, Karamboulas K, Cowan MF, Drysdale LM, Horton WA, Underhill TM. 2006. BMP action in skeletogenesis involves attenuation of retinoid signaling. *J Cell Biol* 174(1):101-113.
- Huang X, Birk DE, Goetinck PF. 1999. Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis and fibril organization. *Dev Dyn* 216(4-5):434-441.
- Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V, French SGM. 2006. High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet* 43(9):735-739.
- Hume AN, Buttgereit J, Al-Awadhi AM, Al-Suwaidi SS, John A, Bader M, Seabra MC, Al-Gazali L, Ali BR. 2009. Defective cellular trafficking of missense NPR-B mutants is the major mechanism underlying acromesomelic dysplasia-type Maroteaux. *Hum Mol Genet* 18(2):267-277.
- Hung IH, Yu K, Lavine KJ, Ornitz DM. 2007. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Devel Biol* 307(2):300-313.
- Hunziker EB, Wagner J, Zapf J. 1994. Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *The J Clin Invest* 93(3):1078-1086.
- Hutchison MR. 2012. BDNF alters ERK/p38 MAPK activity ratios to promote differentiation in growth plate chondrocytes. *Mol Endocrinol* 26(8):1406-1416.
- Hwang S, Park SK, Lee HY, Kim SW, Lee JS, Choi EK, You D, Kim CS, Suh N. 2014. miR-140-5p suppresses BMP2-mediated osteogenesis in undifferentiated human mesenchymal stem cells. *FEBS letters* 588(17):2957-2963.
- Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, Chung UI. 2004. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arth & Rheum* 50(11):3561-3573.
- Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. 2003. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130(12):2779-2791.
- Jackson GC, Barker FS, Jakkula E, Czarny-Ratajczak M, Makitie O, Cole WG, Wright MJ, Smithson SF, Suri M, Rogala P and others. 2004. Missense mutations in the beta strands of the single A-domain of matrilin-3 result in multiple epiphyseal dysplasia. *J Med Genet* 41(1):52-59.
- Jarzabek K, Wolczynski S, Lesniewicz R, Plessis G, Kottler ML. 2012. Evidence that FGFR1 loss-of-function mutations may cause variable skeletal malformations in patients with Kallmann syndrome. *Adv Med Sci* 57(2):314-321.
- Jiao Y, Yan J, Jiao F, Yang H, Donahue LR, Li X, Roe BA, Stuart J, Gu W. 2007. A single nucleotide mutation in *Nppc* is associated with a long bone abnormality in *lbat* mice. *BMC Genet* 8:16.

- Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. 1999. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 19(6):4431-4442.
- Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. 2008. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 20(5):495-501.
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. 1996. Collagen fibril formation. *Biochem J* 316 (Pt 1):1-11.
- Kake T, Kitamura H, Adachi Y, Yoshioka T, Watanabe T, Matsushita H, Fujii T, Kondo E, Tachibe T, Kawase Y and others. 2009. Chronically elevated plasma C-type natriuretic peptide level stimulates skeletal growth in transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(6):E1339-1348.
- Karperien M, van der Eerden BC, Wit JM. 2005. Genomic and non-genomic actions of sex steroids in the growth plate. *Pediatr Nephrol* 20(3):323-329.
- Keene DR, Oxford JT, Morris NP. 1995. Ultrastructural localization of collagen types II, IX, and XI in the growth plate of human rib and fetal bovine epiphyseal cartilage: type XI collagen is restricted to thin fibrils. *J Histochem Cytochem* 43(10):967-979.
- Kemer S, Karademir F, Aydemir G, Kucukodaci Z, Pirgon O, Genc FA, Aydinöz S. 2015. Effects of Inhaled Corticosteroids on the Growth Plates of Infant Rats. *Fetal Pediatr Pathol* 34(4):223-232.
- Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, Fischer B, Yigit G, Janda CY, Becker J and others. 2013. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet* 92(4):565-574.
- Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. 1999. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 80(2):159-170.
- Klatt AR, Becker AK, Neacsu CD, Paulsson M, Wagener R. 2011. The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 43(3):320-330.
- Klopocki E, Hennig BP, Dathe K, Koll R, de Ravel T, Baten E, Blom E, Gillerot Y, Weigel JF, Krüger G and others. 2010. Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E. *Am J Hum Genet* 86(3):434-439.
- Ko Y, Kobbe B, Nicolae C, Miosge N, Paulsson M, Wagener R, Aszodi A. 2004. Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development. *Mol cell Biol* 24(4):1691-1699.
- Kobayashi T, Chung UI, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T, Goad DL, Lanske B, Kronenberg HM. 2002. PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development* 129(12):2977-2986.
- Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. 2005. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J Clin Invest* 115(7):1734-1742.
- Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV. 1991. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252(5002):120-123.

- Komori T. 2005. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 95(3):445-453.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M and others. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5):755-764.
- Kondo E, Yasoda A, Tsuji T, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Tamura N, Arai H, Kunieda T, Nakao K. 2012. Skeletal analysis of the long bone abnormality (Ibab/Ibab) mouse, a novel chondrodysplastic C-type natriuretic peptide mutant. *Calcif Tissue Int* 90(4):307-318.
- Kong L, Tian Q, Guo F, Mucignat MT, Perris R, Sercu S, Merregaert J, Di Cesare PE, Liu CJ. 2010. Interaction between cartilage oligomeric matrix protein and extracellular matrix protein 1 mediates endochondral bone growth. *Matrix Biol* 29(4):276-286.
- Kragelund C, Gronning B, Kober L, Hildebrandt P, Steffensen R. 2005. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *New Eng J Med* 352(7):666-675.
- Krejci P. 2014. The paradox of FGFR3 signaling in skeletal dysplasia: why chondrocytes growth arrest while other cells over proliferate. *Mutat Res Rev Mutat Res* 759:40-48.
- Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, Schaefer F. 2003. 1,25(OH)₂D₃ and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* 73(4):400-410.
- Kronenberg HM. 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423(6937):332-336.
- Kronenberg HM. 2006. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 1068:1-13.
- Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, Ogata N, Katagiri T, Harada Y, Azuma Y and others. 2005. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 280(42):35704-35712.
- Kwan AP, Cummings CE, Chapman JA, Grant ME. 1991. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J Cell Biol* 114(3):597-604.
- Langer LO, Jr. 1967. Mesomelic dwarfism of the hypoplastic ulna, fibula, mandible type. *Radiology* 89(4):654-660.
- Lanktree MB, Guo Y, Murtaza M, Glessner JT, Bailey SD, Onland-Moret NC, Lettre G, Ongen H, Rajagopalan R, Johnson T and others. 2011. Meta-analysis of Dense Genecentric Association Studies Reveals Common and Uncommon Variants Associated with Height. *Am J Hum Genet* 88(1):6-18.
- Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. 2001. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 9 Suppl A:S69-75.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro α 1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17(4):2336-2346.

- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17(19):5718-5733.
- Leri A, Weill J. 1929. Une affection congenitale et symetrique du development osseuse: la dyschondrosteose. *Bull Soc Med Hop.* 53:1491-4.
- Li SW, Prockop DJ, Helminen H, Fassler R, Lapvetelainen T, Kiraly K, Peltarri A, Arokoski J, Lui H, Arita M and others. 1995. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev* 9(22):2821-2830.
- Liu CF, Lefebvre V. 2015. The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis. *Nucleic acids res* 43(17):8183-8203.
- Liu CJ, Zhang Y, Xu K, Parsons D, Alfonso D, Di Cesare PE. 2007. Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. *Front Biosci* 12:3899-3910.
- Liu H, Chen CH, Espinoza-Lewis RA, Jiao Z, Sheu I, Hu X, Lin M, Zhang Y, Chen Y. 2011. Functional redundancy between human SHOX and mouse Shox2 genes in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function. *J Biol Chem* 286(19):17029-17038.
- Liu Y, Zhang ZC, Qian SW, Zhang YY, Huang HY, Tang Y, Guo L, Li X, Tang QQ. 2013. MicroRNA-140 promotes adipocyte lineage commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells via targeting osteopetrosis-associated transmembrane protein 1. *J Biol Chem* 288(12):8222-8230.
- Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM. 2002. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev* 16(7):859-869.
- Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.
- Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. 2002. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis* 33(2):77-80.
- Lorget F, Kaci N, Peng J, Benoist-Lasselin C, Mugniery E, Oppeneer T, Wendt DJ, Bell SM, Bullens S, Bunting S and others. 2012. Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a Fgfr3 mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet* 91(6):1108-1114.
- Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S, Yang Y. 2008. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* 135(11):1947-1956.
- Maor G, Segev Y, Phillip M. 1999. Testosterone stimulates insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I-receptor gene expression in the mandibular condyle--a model of endochondral ossification. *Endocrinology* 140(4):1901-1910.
- Marchini A, Hacker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, Karperien M, Rappold G. 2007. BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet* 16(24):3081-3087.
- Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Hacker B, Rao E, Karperien M, Wit JM and others. 2004. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth

- arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 279(35):37103-37114.
- Mariani FV, Ahn CP, Martin GR. 2008. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* 453(7193):401-405.
- Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN, Davies TF. 2002. Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(24):15776-15781.
- Maroteaux P, Martinelli B, Campailla E. 1971. [Acromesomelic dwarfism]. *La Presse medicale* 79(42):1839-1842.
- Martinez-Glez V, Valencia M, Caparros-Martin JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J, Pulido V, Lindert U, Rohrbach M, Eyre D and others. 2012. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 33(2):343-350.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
- Mates L, Nicolae C, Morgelin M, Deak F, Kiss I, Aszodi A. 2004. Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. *Matrix Biol* 23(3):195-204.
- Melrose J, Smith SM, Smith MM, Little CB. 2008. The use of Histochoice for histological examination of articular and growth plate cartilages, intervertebral disc and meniscus. *Biotech Histochem* 83(1):47-53.
- Mercader N, Leonardo E, Piedra ME, Martinez AC, Ros MA, Torres M. 2000. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* 127(18):3961-3970.
- Michigami T. 2013. Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci* 70(22):4213-4221.
- Minamino N, Makino Y, Tateyama H, Kangawa K, Matsuo H. 1991. Characterization of immunoreactive human C-type natriuretic peptide in brain and heart. *Biochem Biophys Res Commun* 179(1):535-542.
- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. 2002. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3(3):439-449.
- Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. 2001. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128(22):4523-4534.
- Miura K, Kim OH, Lee HR, Namba N, Michigami T, Yoo WJ, Choi IH, Ozono K, Cho TJ. 2014. Overgrowth syndrome associated with a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) gene. *Am J Med Genet Part A* 164A(1):156-163.
- Miura K, Namba N, Fujiwara M, Ohata Y, Ishida H, Kitaoka T, Kubota T, Hirai H, Higuchi C, Tsumaki N and others. 2012. An overgrowth disorder associated with excessive production of cGMP due to a gain-of-function mutation of the natriuretic peptide receptor 2 gene. *PloS one* 7(8):e42180.

- Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, Kato Y, Takemoto F, Nakasa T, Yamashita S and others. 2010. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev* 24(11):1173-1185.
- Moon AM, Capecchi MR. 2000. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 26(4):455-459.
- Mori Y, Mori D, Chung UI, Tanaka S, Heierhorst J, Buchou T, Baudier J, Kawaguchi H, Saito T. 2014. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral ossification during skeletal development. *Biomed Res* 35(4):243-250.
- Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol & Metabol* 80(12):3689-3698.
- Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S and others. 1994. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet* 8(3):269-274.
- Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, Glass IA, Batch JA. 2004. Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Biol Chem* 279(8):4130-4135.
- Murakami S, Balmes G, McKinney S, Zhang Z, Givol D, de Crombrughe B. 2004. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev* 18(3):290-305.
- Murphy JM, Heinegard R, McIntosh A, Sterchi D, Barry FP. 1999. Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. *Matrix Biol* 18(5):487-497.
- Myllyharju J. 2014. Extracellular matrix and developing growth plate. *Curr Osteoporos Rep* 12(4):439-445.
- Nagy A, Kenesi E, Rentsendorj O, Molnar A, Szenasi T, Sinko I, Zvara A, Oommen ST, Barta E, Puskas LG and others. 2011. Evolutionarily conserved, growth plate zone-specific regulation of the matrilin-1 promoter: L-Sox5/Sox6 and Nfi factors bound near TATA finely tune activation by Sox9. *Mol Cell Biol* 31(4):686-699.
- Nakashima A, Katagiri T, Tamura M. 2005. Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 280(45):37660-37668.
- Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM. 1998. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125(24):4977-4988.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P. 1997. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Devel Biol* 183(1):108-121.
- Nicolae C, Ko YP, Miosge N, Niehoff A, Studer D, Enggist L, Hunziker EB, Paulsson M, Wagener R, Aszodi A. 2007. Abnormal collagen fibrils in cartilage of matrilin-1/matrilin-3-deficient mice. *J Biol Chem* 282(30):22163-22175.

- Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Muller U. 2004. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74(3):558-563.
- Niesler B, Fischer C, Rappold GA. 2002. The human SHOX mutation database. *Hum Mutat* 20(5):338-341.
- Nifuji A, Kellermann O, Noda M. 2004. Noggin inhibits chondrogenic but not osteogenic differentiation in mesodermal stem cell line C1 and skeletal cells. *Endocrinology* 145(7):3434-3442.
- Nifuji A, Noda M. 1999. Coordinated expression of noggin and bone morphogenetic proteins (BMPs) during early skeletogenesis and induction of noggin expression by BMP-7. *J Bone Miner Res* 14(12):2057-2066.
- Nilsson O, Parker EA, Hegde A, Chau M, Barnes KM, Baron J. 2007. Gradients in bone morphogenetic protein-related gene expression across the growth plate. *J Endocrinol* 193(1):75-84.
- Nilsson S, Koehler KF. 2005. Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: molecular and cellular pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96(1):15-25.
- Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. 2011. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 57(2):131-140.
- Niswander L. 2002. Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. *Int J Dev Biol* 46(7):877-881.
- Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A. 1992. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Acad Sci USA* 89(20):9826-9830.
- Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, Prickett TC, Espiner EA, Potter LR, Warman ML. 2006. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol & Metab* 91(4):1229-1232.
- Olney RC, Permuy JW, Prickett TC, Han JC, Espiner EA. 2012a. Amino-terminal propeptide of C-type natriuretic peptide (NTproCNP) predicts height velocity in healthy children. *Clin Endocrinol* 77(3):416-422.
- Olney RC, Prickett TC, Espiner EA, Mackenzie WG, Duker AL, Ditro C, Zabel B, Hasegawa T, Kitoh H, Aylsworth AS and others. 2015. C-type natriuretic peptide plasma levels are elevated in subjects with achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 100(2):E355-359.
- Olney RC, Prickett TC, Espiner EA, Ross JL. 2012b. C-Type Natriuretic Peptide (CNP) levels are altered in boys with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97(11):4206-4211.
- Ornitz DM, Marie PJ. 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16(12):1446-1465.
- Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. 2004. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14(2):86-93.

- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR and others. 1997. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5):765-771.
- Oz OK, Hirasawa G, Lawson J, Nanu L, Constantinescu A, Antich PP, Mason RP, Tsyganov E, Parkey RW, Zerwekh JE and others. 2001a. Bone phenotype of the aromatase deficient mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79(1-5):49-59.
- Oz OK, Millsaps R, Welch R, Birch J, Zerwekh JE. 2001b. Expression of aromatase in the human growth plate. *J Mol Endocrinol* 27(2):249-253.
- Ozasa A, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, Sakuma Y, Nakatsuru Y, Arai H, Itoh N, Nakao K. 2005. Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and the MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. *Bone* 36(6):1056-1064.
- Pan Q, Yu Y, Chen Q, Li C, Wu H, Wan Y, Ma J, Sun F. 2008. *Sox9*, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol* 217(1):228-241.
- Park J, Park OJ, Yoon WJ, Kim HJ, Choi KY, Cho TJ, Ryoo HM. 2012. Functional characterization of a novel FGFR2 mutation, E731K, in craniosynostosis. *J Cell Biochem* 113(2):457-464.
- Peake NJ, Hobbs AJ, Pinguan-Murphy B, Salter DM, Berenbaum F, Chowdhury TT. 2014. Role of C-type natriuretic peptide signalling in maintaining cartilage and bone function. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 22(11):1800-1807.
- Person AD, Beiraghi S, Sieben CM, Hermanson S, Neumann AN, Robu ME, Schleiffarth JR, Billington CJ, Jr., van Bokhoven H, Hooeboom JM and others. 2010. *WNT5A* mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev Dyn* 239(1):327-337.
- Peters K, Ornitz D, Werner S, Williams L. 1993. Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev Biol* 155(2):423-430.
- Pilz RB, Casteel DE. 2003. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circulation research* 93(11):1034-1046.
- Pizette S, Niswander L. 2000. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol* 219(2):237-249.
- Posey KL, Alcorn JL, Hecht JT. 2014. Pseudoachondroplasia/COMP - translating from the bench to the bedside. *Matrix Biol* 37:167-173.
- Posey KL, Veerisetty AC, Liu P, Wang HR, Poindexter BJ, Bick R, Alcorn JL, Hecht JT. 2009. An inducible cartilage oligomeric matrix protein mouse model recapitulates human pseudoachondroplasia phenotype. *Am J Pathol* 175(4):1555-1563.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine reviews* 27(1):47-72.
- Provot S, Nachtrab G, Paruch J, Chen AP, Silva A, Kronenberg HM. 2008. A-raf and B-raf are dispensable for normal endochondral bone development, and parathyroid hormone-related

- peptide suppresses extracellular signal-regulated kinase activation in hypertrophic chondrocytes. *Mol Cell Biol* 28(1):344-357.
- Puskaric S, Schmitteckert S, Mori AD, Glaser A, Schneider KU, Bruneau BG, Blaschke RJ, Steinbeisser H, Rappold G. 2010. Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Hum Mol Genet* 19(23):4625-4633.
- Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA. 2001. The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* 10(26):3083-3091.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M and others. 1997. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16(1):54-63.
- Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B. 2007. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 44(5):306-313.
- Rentsendorj O, Nagy A, Sinko I, Daraba A, Barta E, Kiss I. 2005. Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *Biochem J* 389(Pt 3):705-716.
- Reznikoff C, Tegtmeyer P, Dohan C, Jr., Enders JF. 1972. Isolation of AGMK cells partially resistant to SV40: identification of the resistant step. *Proc Soc Exp Biol Med* 141(2):740-746.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75(7):1401-1416.
- Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. 2000. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology* 141(10):3887-3897.
- Rosin JM, Kurrasch DM, Cobb J. 2015a. Shox2 is required for the proper development of the facial motor nucleus and the establishment of the facial nerves. *BMC Neurosci* 16:39.
- Rosin JM, McAllister BB, Dyck RH, Percival CJ, Kurrasch DM, Cobb J. 2015b. Mice lacking the transcription factor SHOX2 display impaired cerebellar development and deficits in motor coordination. *Devel Biol* 399(1):54-67.
- Ross JL, Cassorla FG, Skerda MC, Valk IM, Loriaux DL, Cutler GB, Jr. 1983. A preliminary study of the effect of estrogen dose on growth in Turner's syndrome. *New Eng J Med* 309(18):1104-1106.
- Ross JL, Scott C, Jr., Marttila P, Kowal K, Nass A, Papenhausen P, Abboudi J, Osterman L, Kushner H, Carter P and others. 2001. Phenotypes Associated with SHOX Deficiency. *J Clin Endocrinol & Metab* 86(12):5674-5680.
- Sabherwal N, Blaschke RJ, Marchini A, Heine-Suner D, Rosell J, Ferragut J, Blum WF, Rappold G. 2004a. A novel point mutation A170P in the SHOX gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Leri-Weill dyschondrosteosis and Langer dysplasia. *J Med Genet* 41(6):e83.

- Sabherwal N, Schneider KU, Blaschke RJ, Marchini A, Rappold G. 2004b. Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Leri-Weill syndrome. *J Cell Sci* 117(Pt 14):3041-3048.
- Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. 2007. S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep* 8(5):504-509.
- Sandell LJ, Sugai JV, Trippel SB. 1994. Expression of collagens I, II, X, and XI and aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ. *J Orthop Res* 12(1):1-14.
- Schmid TM, Linsenmayer TF. 1985. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* 100(2):598-605.
- Schmid TM, Linsenmayer TF. 1990. Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. *Dev Biol* 138(1):53-62.
- Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, Roth R, Niesler B, Marttila T, Blaschke RJ, Lawson M, Dunic M, Rappold G. 2005. Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat* 26(1):44-52.
- Semina EV, Reiter RS, Murray JC. 1998. A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Hum Mol Genet* 7(3):415-422.
- Sharma VP, Wall SA, Lord H, Lester T, Wilkie AO. 2012. Atypical Crouzon syndrome with a novel Cys62Arg mutation in FGFR2 presenting with sagittal synostosis. *Cleft Palate Craniofac J* 49(3):373-377.
- Shears DJ, Guillen-Navarro E, Sempere-Miralles M, Domingo-Jimenez R, Scambler PJ, Winter RM. 2002. Pseudodominant inheritance of Langer mesomelic dysplasia caused by a SHOX homeobox missense mutation. *Am J Med Genet* 110(2):153-157.
- Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ, Winter RM. 1998. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 19(1):70-73.
- Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, Tang D, Harris SE, Mishina Y, O'Keefe RJ and others. 2011. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J Cell Sci* 124(Pt 20):3428-3440.
- Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM, Angelucci L, Bonucci E. 2000. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* 26(1):33-42.
- Simeone A, D'Apice MR, Nigro V, Casanova J, Graziani F, Acampora D, Avantaggiato V. 1994. Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and Drosophila. *Neuron* 13(1):83-101.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *New Eng J Med* 331(16):1056-1061.

- Smits P, Dy P, Mitra S, Lefebvre V. 2004. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J Cell Biol* 164(5):747-758.
- Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. 2001. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1(2):277-290.
- Sogawa C, Tsuji T, Shinkai Y, Katayama K, Kunieda T. 2007. Short-limbed dwarfism: slw is a new allele of Npr2 causing chondrodysplasia. *J Hered* 98(6):575-580.
- Soranzo N, Rivadeneira F, Chinappan-Horsley U, Malkina I, Richards JB, Hammond N, Stolk L, Nica A, Inouye M, Hofman A and others. 2009. Meta-analysis of genome-wide scans for human adult stature identifies novel Loci and associations with measures of skeletal frame size. *PLoS Genet* 5(4):e1000445.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13(16):2072-2086.
- Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, Pintor S, Morizio E, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Rinaldi MM, Scarano G, Concolino D and others. 2003. SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. *J Med Genet* 40(2):E11.
- Su P, Ding H, Huang D, Zhou Y, Huang W, Zhong L, Vyse TJ, Wang Y. 2011. A 4.6 kb genomic duplication on 20p12.2-12.3 is associated with brachydactyly type A2 in a Chinese family. *J Med Genet* 48(5):312-316.
- Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, Takigawa T, Uehira M, Nishimoto H, Itoh H, Saito Y and others. 1998. Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5):2337-2342.
- Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K and others. 1992. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130(1):229-239.
- Sun X, Mariani FV, Martin GR. 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418(6897):501-508.
- Suzuki S, Yoshimura M, Nakayama M, Mizuno Y, Harada E, Ito T, Nakamura S, Abe K, Yamamuro M, Sakamoto T and others. 2004. Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognostic marker after acute myocardial infarction: a long-term follow-up analysis. *Circulation* 110(11):1387-1391.
- Tabin C, Wolpert L. 2007. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* 21(12):1433-1442.
- Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. 2004. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(49):17300-17305.

- Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M and others. 2000. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):4239-4244.
- Tassano E, Buttgereit J, Bader M, Lerone M, Divizia MT, Bocciardi R, Napoli F, Pala G, Sloan-Bena F, Gimelli S and others. 2013. Genotype-Phenotype Correlation of 2q37 Deletions Including Gene Associated with Skeletal Malformations. *PloS one* 8(6):e66048.
- Tickle C. 2003. Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Dev Cell* 4(4):449-458.
- Tickle C, Summerbell D, Wolpert L. 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 254(5497):199-202.
- Tiecke E, Bangs F, Blaschke R, Farrell ER, Rappold G, Tickle C. 2006. Expression of the short stature homeobox gene *Shox* is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol* 298(2):585-596.
- Tivesten A, Moverare-Skrtic S, Chagin A, Venken K, Salmon P, Vanderschueren D, Savendahl L, Holmang A, Ohlsson C. 2004. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 19(11):1833-1839.
- Tsuji T, Kondo E, Yasoda A, Inamoto M, Kiyosu C, Nakao K, Kunieda T. 2008. Hypomorphic mutation in mouse *Nppc* gene causes retarded bone growth due to impaired endochondral ossification. *Biochem Biophys Res Commun* 376(1):186-190.
- Tsuji T, Kunieda T. 2005. A loss-of-function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (*Npr2*) gene is responsible for disproportionate dwarfism in *cn/cn* mouse. *J Biol Chem* 280(14):14288-14292.
- Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini MK, Clark I, Dalmay T. 2006. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS letters* 580(17):4214-4217.
- Urbanek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. 1994. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking *Pax5/BSAP*. *Cell* 79(5):901-912.
- van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. 2003. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine rev* 24(6):782-801.
- van der Weyden L, Wei L, Luo J, Yang X, Birk DE, Adams DJ, Bradley A, Chen Q. 2006. Functional knockout of the *matrilin-3* gene causes premature chondrocyte maturation to hypertrophy and increases bone mineral density and osteoarthritis. *Am J Pathol* 169(2):515-527.
- Van Vliet G, Larroque B, Bubuteishvili L, Supernant K, Leger J, Association of Francaise pour le Depistage et la Prevention des Handicaps de IE. 2003. Sex-specific impact of congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis on skeletal maturation in term newborns. *J Clin Endocrinol & Metab* 88(5):2009-2013.
- Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MF, Quedas EP, Nishi MY, Arnhold IJ, Hasegawa T, Jorge AA. 2013. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (*NPR2*) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 98(10):E1636-1644.

- Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA and others. 2004. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119(4):555-566.
- Vickerman L, Neufeld S, Cobb J. 2011. Shox2 function couples neural, muscular and skeletal development in the proximal forelimb. *Dev Biol* 350(2):323-336.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93(3):411-422.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E and others. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79(6):1111-1120.
- Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, van Duyvenvoorde HA and others. 2005. Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 90(5):2855-2864.
- Walker DG. 1957. An assay of the skeletogenic effect of L-triiodothyronine and its acetic acid analogue in immature rats. *Bull Johns Hopkins Hosp* 101(2):101-114.
- Wang J, Zhou J, Bondy CA. 1999. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(14):1985-1990.
- Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, Edmund AB, Robinson JW, Olney RC, Miller TC, Moon JE, Mericq V, Potter LR and others. 2015. Heterozygous Mutations in Natriuretic Peptide Receptor-B (NPR2) Gene as a Cause of Short Stature. *Hum Mutat* Apr;36(4):474-81.
- White KE, Cabral JM, Davis SI, Fishburn T, Evans WE, Ichikawa S, Fields J, Yu X, Shaw NJ, McLellan NJ and others. 2005. Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. *Am J Hum Genet* 76(2):361-367.
- Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. 1991. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol* 11(7):3454-3462.
- Wilkie AO. 2005. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):187-203.
- Wilkie AO, Patey SJ, Kan SH, van den Ouweland AM, Hamel BC. 2002. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. *Am J Med Genet* 112(3):266-278.
- Wilkinson CC, Manchester DK, Keating RF, Ketch LL, Winston KR. 2012. Syndromic craniosynostosis, fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) mutations, and sacroccygeal eversion presenting as human tails. *Childs Nerv Syst* 28(8):1221-1226.
- Wilson DS, Guenther B, Desplan C, Kuriyan J. 1995. High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell* 82(5):709-719.
- Wit JM, Kamp GA, Rikken B. 1996. Spontaneous growth and response to growth hormone treatment in children with growth hormone deficiency and idiopathic short stature. *Pediatr Res* 39(2):295-302.

- Woods A, Wang G, Beier F. 2005. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J Biol Chem* 280(12):11626-11634.
- Woods CG, Stricker S, Seemann P, Stern R, Cox J, Sherridan E, Roberts E, Springell K, Scott S, Karbani G and others. 2006. Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including Fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *Am J Hum Genet* 79(2):402-408.
- Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q. 2003. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem* 278(28):25847-25852.
- Wu XL, Gu MM, Huang L, Liu XS, Zhang HX, Ding XY, Xu JQ, Cui B, Wang L, Lu SY and others. 2009. Multiple synostoses syndrome is due to a missense mutation in exon 2 of FGF9 gene. *Am J Hum Genet* 85(1):53-63.
- Xie Y, Zhou S, Chen H, Du X, Chen L. 2014. Recent research on the growth plate: Advances in fibroblast growth factor signaling in growth plate development and disorders. *J Mol Endocrinol* 53(1):T11-34.
- Xing W, Govoni KE, Donahue LR, Kesavan C, Wergedal J, Long C, Bassett JH, Gogakos A, Wojcicka A, Williams GR and others. 2012. Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal insulin-like growth factor-I expression and bone acquisition in mice. *J Bone Miner Res* 27(5):1067-1079.
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci* 96(13):7324-7329.
- Yakar S, Wu Y, Setser J, Rosen CJ. 2002. The role of circulating IGF-I: lessons from human and animal models. *Endocrine* 19(3):239-248.
- Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, Asahara H. 2012. L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity. *J Biol Chem* 287(26):22206-22215.
- Yang B, Guo H, Zhang Y, Chen L, Ying D, Dong S. 2011. MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *PloS one* 6(7):e21679.
- Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rigi T, Tanaka S, Suda M and others. 2004. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 10(1):80-86.
- Yeung VT, Ho SK, Nicholls MG, Cockram CS. 1996. Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP. *Peptides* 17(1):101-106.
- Yoder AR, Kruse AC, Earhart CA, Ohlendorf DH, Potter LR. 2008. Reduced ability of C-type natriuretic peptide (CNP) to activate natriuretic peptide receptor B (NPR-B) causes dwarfism in *labb -/-* mice. *Peptides* 29(9):1575-1581.
- Yoon BH, Esquivies L, Ahn C, Gray PC, Ye SK, Kwiatkowski W, Choe S. 2014. An activin A/BMP2 chimera, AB204, displays bone-healing properties superior to those of BMP2. *J Bone Miner Res* 29(9):1950-1959.

- Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y and others. 2004. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18(8):952-963.
- Yu L, Gu S, Alappat S, Song Y, Yan M, Zhang X, Zhang G, Jiang Y, Zhang Z, Zhang Y and others. 2005. Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* 132(19):4397-4406.
- Yu L, Liu H, Yan M, Yang J, Long F, Muneoka K, Chen Y. 2007. Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* 306(2):549-559.
- Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE, Chen D, Tsao C, Deng HW, Zhao M. 2013. Wnt/beta-catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone* 52(1):145-156.
- Zhang Y, Chen Q. 2000. Changes of matrilin forms during endochondral ossification. Molecular basis of oligomeric assembly. *J Biol Chem* 275(42):32628-32634.
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, de Crombrughe B. 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 209(4):377-386.
- Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. 2003. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 162(5):833-842.
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B. 2006. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(50):19004-19009.
- Zimmermann P, Boeuf S, Dickhut A, Boehmer S, Olek S, Richter W. 2008. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. *Arth & Rheum* 58(9):2743-2753.
- Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CI, Jr., Marttila P, Ross JL. 2002. Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 110(2):158-163.

Anexo I

Tabla 1. Patologías asociadas a los genes de la MEC de cartilago.

Gen	Patología (Tipo de herencia*)
<i>COL2A1</i>	Acondrogénesis tipo 2 (AD) Hipocondrogénesis (AD) Displasia espondiloepifisaria congénita (AD) Displasia espondiloperiférica (AD) Displasia de Kniest (AD) Síndrome de Stickler tipo 1 (AD)
<i>COL11A1</i>	Síndrome de Stickler tipo 2 (AD) Síndrome de Marshall (AD) Fibrocondrogénesis (AR)
<i>COL11A2</i>	Síndrome de Stickler tipo 3 (AD) Displasia oto-espondilo-megaepifisaria (AR, AD)
<i>COL9A1</i>	Displasia epifisaria múltiple tipo 6 (AD) Síndrome de Stickler tipo recesivo (AR)
<i>COL10A1</i>	Displasia metafisaria de Schmid (AD)
<i>AGC1</i>	Displasia espondiloepifisaria de tipo Kimberley (AD) Displasia espondiloepifisaria de tipo agrecano (AR) Osteocondritis disecante familiar (AD)
<i>COMP</i>	Pseudoacondroplasia (AD) Displasia epifisaria múltiple tipo 1 (AD)
<i>MATN3</i>	Displasia epifisaria múltiple tipo 5 (AD)
<i>MMP9</i>	Anadisplasia metafisaria tipo 2 (AR)
<i>MMP13</i>	Anadisplasia metafisaria tipo 1 (AR, AD) Anadisplasia metafisaria tipo Spahr (AR)

*AD: autosómico dominante. AR: autosómico recesivo. Datos obtenidos de Bonafe et al. 2015.

Tabla 2. Resumen de los mecanismos de regulación de la placa de crecimiento.

Mecanismo de regulación	Proteína o Vía	Función en la placa de crecimiento	Gen y patología asociada con el crecimiento (tipo de herencia*)
Endocrina	GH/IGF-I	Aumenta la proliferación de los condrocitos de la zona de reserva y de los proliferativos, y disminuye el tamaño de la zona hipertrófica (Ohlsson et al, 1992; Hunziker et al, 1994; Wang et al, 1999).	- <i>GH</i> : talla baja (AR) (Wit et al. 1996). - <i>GHR</i> : síndrome de Laron (AR) (Amselem et al. 1989). - <i>IGF-I</i> : retraso del crecimiento intrauterino y postnatal (AR) y disminución leve de la estatura (-1 DE) (AD) (Walenkamp et al. 2005).
	Glucocorticoides	Producen la inhibición de la proliferación y el aumento de la hipertrofia de los condrocitos (Silvestrini et al 2000; Gafni et al. 2001; Kemer et al. 2015).	No asociado a ninguna enfermedad relacionada con el crecimiento por el momento
	Hormonas Tiroideas	Su deficiencia provoca la desorganización de la placa de crecimiento y defectos en la diferenciación de los condrocitos hacia células hipertróficas (Van Vliet et al. 2003).	- <i>TSHR</i> : El hipotiroidismo congénito primario está asociado con problemas severos en el crecimiento (AR) (Boersma et al. 1996; Marians et al. 2002). - <i>THRA</i> : La resistencia a la hormona tiroidea provoca talla baja (AD) (Bochukova et al. 2012).
	Estrógenos	Bajas concentraciones estimulan el crecimiento y altas concentraciones dan lugar a su cese (Ross et al 1983). También estimulan la síntesis de GH.	- <i>ER-α</i> : causa el síndrome de resistencia a estrógenos que cursa con sobrecrecimiento (AR) (Smith et al. 1994).
	Andrógenos	Estimulan la proliferación y la diferenciación de los condrocitos, la producción de matriz extracelular y la expresión local de IGF-I (Maor et al., 1999; Krohn et al., 2003).	No asociado a ninguna enfermedad relacionada con el crecimiento por el momento
Paracrina	FGFs y FGFRs	FGFR3 disminuye la proliferación y promueve la diferenciación de los condrocitos (Colvin et al. 1996; Deng et al. 1996; Ornitz y Marie 2002). Los ratones <i>knock-out</i> de <i>Fgf18</i> y <i>Fgfr3</i> muestran enanismo (Colvin et al. 1996; Liu et al. 2002), y el de <i>Fgf9</i> presenta acortamiento desproporcionado de los segmentos esqueléticos proximales (Hung et al. 2007).	Las más importantes son: - <i>FGFR1</i> : síndrome de Pfeiffer, una forma de craneosinostosis (AD) (Muenke et al. 1994), enanismo osteoglofónico (AD) (White et al. 2005) y síndrome de Kallmann (AD) (Jarzabek et al. 2012). - <i>FGFR2</i> : varios tipos de craneosinostosis como síndrome de Crouzon, Pfeiffer y Apert (AD) (Wilkie 2005, Cunningham et al. 2007, Park et al. 2012, Sharma et al. 2012, Wilkinson et al. 2012). - <i>FGFR3</i> : acondroplasia (AD), hipocondroplasia (AD) y craneosinostosis (síndrome de Crouzon con acantosis nigricans) (AD) (He et al. 2012, Krejci 2014). - <i>FGF9</i> : síndrome de sinostosis múltiple (AD) (Wu et al. 2009).
	BMP	Induce la proliferación e hipertrofia de los condrocitos (De Luca et al. 2001).	- <i>BMP1</i> : osteogénesis imperfecta (AR) (Martinez-Glez et al. 2012). - <i>BMP2</i> : braquidactilia tipo A2 (AD) (Su et al. 2011).
	IHH-PTHrP	Estimulan la proliferación y diferenciación de los condrocitos en la zona proliferativa de la placa de crecimiento (Kronenberg et al. 2006; Kobayashi et al. 2005; Mak et al. 2008).	- <i>IHH</i> : braquidactilia tipo A1 (AD) (Gao et al. 2001; displasia acrocapitofemoral (AR) (Hellemans et al. 2003). - <i>PTHrP</i> : braquidactilia tipo E1 (AD) (Klopocki et al. 2010).
	WNT	Inhibe la condrogénesis en células precondrogénicas,	- <i>WNT1</i> : osteogénesis imperfecta (AR) (Keupp et al. 2013).

		mientras que promueve la hipertrofia en los condrocitos proliferativos (Akiyama et al. 2004).	- <i>WNT3</i> : tetra-amelia (AR) (Niemann et al. 2004). - <i>WNT5</i> : causa el síndrome de Robinow (AR) (Person et al. 2010). - <i>WNT7A</i> : síndrome de Fuhrmann (AR) (Woods et al. 2006).
	CNP/NPR-B/GMPc	Induce la proliferación y la hipertrofia de los conodrocitos (Chusho et al. 2001; Tsuji et al. 2005; Sogawa et al. 2007)	- <i>NPR2</i> : talla baja idiopática (AD), sobrecrecimiento (AD) y displasia acromesomélica de tipo Maroteaux (AR) (Bartels et al. 2004; Vasques et al. 2013; Amano et al. 2014; Wang et al. 2014).
Epigenética	Micro ARNs	Regulan varios procesos a lo largo del desarrollo de los condrocitos (Yang et al. 2011; Michigami 2013).	No asociado a ninguna enfermedad relacionada con el crecimiento por el momento
Factores de transcripción	RUNX2	Regula la maduración de los condrocitos hacia un estado hipertrófico (Enomoto et al. 2001).	- <i>RUNX2</i> : displasia cleidocranial (AD) (Baumert et al. 2005).
	Trío SOX	Juega un papel clave en la diferenciación del cartílago, por si solo produce la señal necesaria para que el proceso se lleve a cabo (Ikeda et al. 2004).	- <i>SOX9</i> : displasia campomélica (AD) (Foster et al. 1994; Wagner et al. 1994).
	SHOX	Regula la proliferación de los condrocitos e induce su apoptosis (Marchini et al. 2004).	- <i>SHOX</i> : discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) (AD) (Shears et al. 1998), displasia mesomélica de Langer (DML) (AR) (Shears et al. 2002) y talla baja idiopática (TBI) (AD) (Chen et al. 2009).
	SHOX2	Shox2 promueve la condrogénesis en sus primeras etapas y el paso de condrocitos proliferativos a hipertróficos (Bobick et al. 2012).	No asociado a ninguna enfermedad relacionada con el crecimiento por el momento

*AD: autosómico dominante. AR: autosómico recesivo.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la construcción de plásmidos.

Técnica (Vector)	Gen	Región	Secuencia del cebador		Enzimas de restricción		Tamaño (pb)
			Sentido (5' - 3')	Antisentido (5' - 3')	Extremo 5'	Extremo 3'	
Luciferasa (pGL3Basic)	<i>Comp</i>	Promotor	GGAGGAGCAAATGTCTGCTG	CTGCTGTCTGCGCCTTCGAG	KpnI	XhoI	1926
	<i>miR-140</i>	Promotor	GACACACCCAGCAGCCCAGT	ACCGACCTCTGCTCAGCTCC	XhoI	HindIII	1026
	<i>S100A1</i>	Promotor	GTACTGCAAGGCCAGCTT	CTCCCCCGCTGACCCCCC	XhoI	HindIII	248
	<i>Matn1</i> (-2074 a +54)	Promotor	AACGAAGGCAGTGGGGTATT	CCGCCGGAGGTTGGATGCAG	KpnI	XhoI	2128
	<i>Matn1</i> (-1212 a +54)	Promotor	GCATCTACTCACAGCCTTAAGCTCC	GCCGGAGGTTGGATGCAG	KpnI	XhoI	1264
	<i>Matn1</i> (-998 a +54)	Promotor	CACTAAGGGCAGGTCCGCTTC	GCCGGAGGTTGGATGCAG	KpnI	XhoI	1052
	<i>Matn1</i> (-842 a +54)	Promotor	CAAATGCAACGCAGGAGTGCTC	GCCGGAGGTTGGATGCAG	KpnI	XhoI	896
	<i>Matn1</i> (-478 a +54)	Promotor	TGTCGCATTCTTTCTCCCTCTG	GCCGGAGGTTGGATGCAG	KpnI	XhoI	530
	<i>MATN1</i>	Promotor	TTGCCCTGTTATAGAATGCCAAAGC	TAGCCCCCATCTCACGCAAGCC	KpnI	XhoI	2711
Hibridación <i>in situ</i> (pGEM-T Easy)	<i>Comp</i>	ADNc	CACCGGCAACGGCTCGCACTGCACCGAC	CACGCCGCTGGCAGCCTGACGTCTGGTC	*	*	322
	<i>Matn1</i>	ADNc	CTGTGCTTGTGAGTCCATAC	CTGACTGGGTAAAGAATTAAGTGG	*	*	497

*: El vector utiliza las colas de adenina añadidas en la PCR para realizar la ligación, no necesita de enzimas de restricción.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores utilizados para la mutagénesis de *MATN1*, *NPR2* y *NPPC*.

Gen	Especie	Mutación	Secuencia cebador (5'-3')
<i>Matn1</i>	<i>G. gallus</i>	<i>Pe1M1</i>	CCATCCCCTTCTCCGAG <u>GG</u> ATCGAGCCATTGTGGAGGGG
		<i>IneM2</i>	GGGCCAAGGCTCCCG <u>CGCGCT</u> A <u>GGCA</u> GCATCCAACCTCCGG
<i>MATN1</i>	<i>H. sapiens</i>	c.-199C>T	GCCAGGCTCTCC <u>T</u> GCCCTCTCAGGG
		c.-199C>A	GCCAGGCTCTCC <u>A</u> GCCCTCTCAGGG
		c.-198_-196del	GCCAGGCTCTC/CCCTCTCAGGG
<i>NPR2</i>	<i>H. sapiens</i>	p.Ala164Gly	GCACTTCAATTGGACTG <u>G</u> CCGTGCTGCCTTGCTGTACC
		p.Asp256Y	GGGGATTATGTCTTCTTTTACCTG <u>T</u> ATGTCTTTGGGG
		p.Thr421Met	GAAGCAGATTTGGTGGA <u>T</u> GGGACGGCCTATTCCC
		p.Asn546Tyr	CGGTCACTTCAAGGGA <u>T</u> ATGTTGTCGCCATCAAAC
		p.Val548del	GTCACCTTCAAGGGAAATGT/CGCCATCAAACATGTG
		p.Glu991Gly	CACTGCTTCTCGAATGG <u>G</u> GTCTAATGGTCAAGCGC
		p.Arg1020Trp	GCTTCCAGCTAGAGCT <u>T</u> GGGGGGATGTGGAAATG
<i>NPPC</i>	<i>H. sapiens</i>	p.Arg117Gly	GGCCTCAAGCTGGAC <u>G</u> GAATCGGCTCCATGAGC
		p.Gly119Cys	GGCCTCAAGCTGGACCGAATC <u>T</u> GCTCCATGAGC

El nucleótido mutado está señalado en negrita y subrayado, en el caso de la delección de 3 pares de bases, una barra invertida indica el lugar de la delección. Los cebadores anti-sentido usados en la mutagénesis, son la secuencia reversa complementaria a la mostrada.

Tabla 8. Características de los cebadores usados para la PCR Cuantitativa.

Gen	Secuencia del cebador		Diseño propio o referencia
	Sentido (5' - 3')	Antisentido (5' - 3')	
<i>Comp</i>	ACTGCCTGCGTTCTAGTGC	CGCCGCATTAGTCTCCTGAA	Diseño propio
<i>Matn1</i>	CTGTGCTTGTGAGTCCATAC	CAGGCCACCAGAGTTCTTAG	Feenstra et al. 2012
<i>Col2a1</i>	CCTCCGTCTACTGTCCACTGA	ATTGGAGCCCTGGATGAGCA	Bobick et al. 2012
<i>S100a1</i>	CCTTCTGTGCGAGAATCTGTTCC	TTATATTTGTCCCCTTCCTTGC	Diseño propio
<i>miR-140</i>	TCCTGCAGATGAGTTGTTCTGT	AACAGCATGACGTAACCTACCA	Yamashita et al. 2012
<i>Shox2</i>	TGGAACAACCTCAACGAGCTGGAGA	TTCAAACCTGGCTAGCGGCTCCTAT	Bobick et al. 2012
<i>Sox9</i>	ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG	TCAGAAGTCTCCAGAGCTTG	Bobick et al. 2012
<i>Bmp2</i>	CCTCAAGTCCAGCTGCAAGAG	GGTGCCACGATCCAGTCATT	Bobick et al. 2012
<i>Bmp4</i>	CTGCGGGACTTCGAGGCGACACTTCT	TCTTCCTCCTCCTCCTCCCCAGACTG	Bobick et al. 2012
<i>Acan</i>	TCACTGTTACCGCCACTTTCC	TGCTGCTCAGATGTGACTGC	Bobick et al. 2012
<i>Actb</i>	TTAATTTCTGAATGGCCAGGTCT	ATTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGG	Bobick et al. 2012
<i>Tbp</i>	CCGTGAATCTTGGCTGTAAACTTG	GTTGTCCGTGGCTCTCTTATTCTC	Bobick et al. 2012
<i>SHOX</i>	CCAGAAAAGCAAGGACGGTA	TCCCGGTACGTAATGGAATC	Diseño propio
<i>SHOX2</i>	GTGTTCTCATAGGGGCCGCCAGC	ACAGCGCTGTCCAGCTGCAGCTGCG	Schneider et al. 2011
<i>SOX6</i>	TGAGGAGCTACCAACACTTGTC	TCGGAAGGAATATAGGGAACATAACT	Haag et al. 2008
<i>SOX9</i>	ACACACAGCTCACTCGACCTTG	GGAATTCTGGTTGGTCCTCTCTT	Haag et al. 2008

Tabla 9. Características de las PCR llevadas a cabo en la búsqueda de mutaciones del promotor de *MATN1*, *NPR2* y *NPPC*.

Gen	Exón	Secuencia del cebador		Temp. Ani.	Tamaño
<i>MATN1</i>	Promotor**	GCTGCAGAGCATGAGGCTAGTG	CAAAGGAGCCCTTGTGGTCAGA	62	290
	Promotor**	CCCCAACTGACGACTGACGTG	CGGGCCATTGGACTCAGGTATG	62	289
<i>NPR2</i>	1a*	CCCCACCCCATCCAGTCCCA	TACAGGGGAGACGCGAGCAC	63	315
	1b*	CCCCGCCTTCCTCCCATCTCC	AGAGCCTCCACAGCTAGTGCCACA	66	335
	1c*	CAGGTGGGGTGCGTCCTC	CAGCACCCGCACTCAGCA	66	333
	1d*	TCCCGGTTGCGTGTAACCCTG	CCAGTGCTGAGCTTTAGGGACACA	66	443
	2	CTTTCTTGCTGAAGAGGGACATC	AATTCTGCCTGGTTCCTAGGGTT	65	410
	3	CCCTTTCAAAGCCTTCAGACTCA	AAAGTTGGGCTTGCTCCACA	59	354
	4	AGGGATGGCACTTTAGGAA	TTCTTCTTCAGCCCACTCTATT	59	333
	5	AGGGTAGACTCTGAGGGAGC	GAGAAAACAAATCCCTCATCTAGTA	59	291
	6	TCCTGGCTGGGTGGTAGGCT	AGTGAGGGTGGAGGCCATGAAT	65	308
	7	GCAGCTTTCCTCCCTTTGCTTTC	AGGCTAGAGAGGAAGACGCTGTT	61	444
	8	CCCTGCAACCCTGCTGTTGG	GGGTAAGAAGGGACAGGAATCAGA	65	255
	9	TCTCTCCAGCACATTGGCTTGTA	GGTGGCAGATGGGGATGAGA	65	238
	10	CTAGCATTTCTTGTACCCAG	CTTACCACTACATAAGAGGACCTTT	59	301
	11 - 12	TTTTAACTCTTTCAATTTTCTTATC	AGGAGAAAAACCACAATCAAA	59	426
	13	ATCTCATGGAGAGAGGGTATTCTA	GCTCATCCCTATATTACTGTCACTC	59	326
	14	GAGTGACAGTAATATAGGGATGAGC	TGAGGGTGATCAAAGGTTTGG	59	320
	15	GTAAGAGTCAATCCACTACCCACA	CCCCTTCATGCACTAGGACTAATG	59	318
	16	CCCAGGGATAGAAGACTCATTAGT	ATGACAGCAAATAATCTATAAGCAG	59	425
	17	CCTCCACCTGAAAAGCCTA	ATGTGGGAACTCTAGAACAACTCA	TD 67>59	353
	18	CTTTTGATGGCTTGTGGGTTAAGAA	GGTAAGGTGTGTGGGGTTCAG	59	236
	19	AGACATCTCCTCTCCCCTAGACTCA	GTGGAGACTAGGGCTGGAGTGA	59	380
	20	ACTAGATGCAGTTTCTTCTTTTCG	TAAGAAATTGGAGGGATTATGAAAA	59	329
	21	GCACGGTGCTATACAGTATCAC	GGGAGAGTGGACATGATTGAG	59	303
	22a	GATGCTTCCAGCTAGAGCTTCG	TGCAGAGGGCTACAACCTCCA	59	394
	22b	AAATGGACATTTTCATATGCAA	CCCAAGACTGCTAATTTAGTGA	59	291
<i>NPPC</i>	1**	GCCCTGCAGCCAGCCAGCC	CCACGCGCATCTCGGAGGAG	66	319
	2**	CTCTGGGCTTGGGAGGGACAC	CGTACTCACCGCCGCCAGG	62	432

*+ 5% DMSO; **+10% DMSO. TD: *Touchdown* PCR. Temp. Ani.: Temperatura de anillamiento.

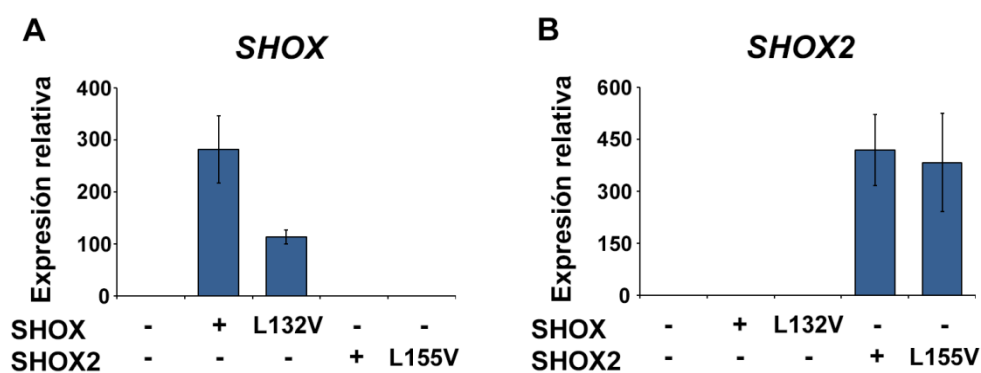


Figura 11. Confirmación de la sobreexpresión de *SHOX* y *SHOX2*. Comparación, mediante PCR cuantitativa, de los niveles de expresión de los genes *SHOX* (A) y *SHOX2* (B) entre células 10T1/2 de ratón transfectadas con distintas combinaciones de vectores de expresión (pcDNA3.1) *SHOX*, *SHOX2* y sus mutantes p.L132V y p.L155V, respectivamente. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. *SHOX* y *SHOX2* se sobreexpresaron correctamente.

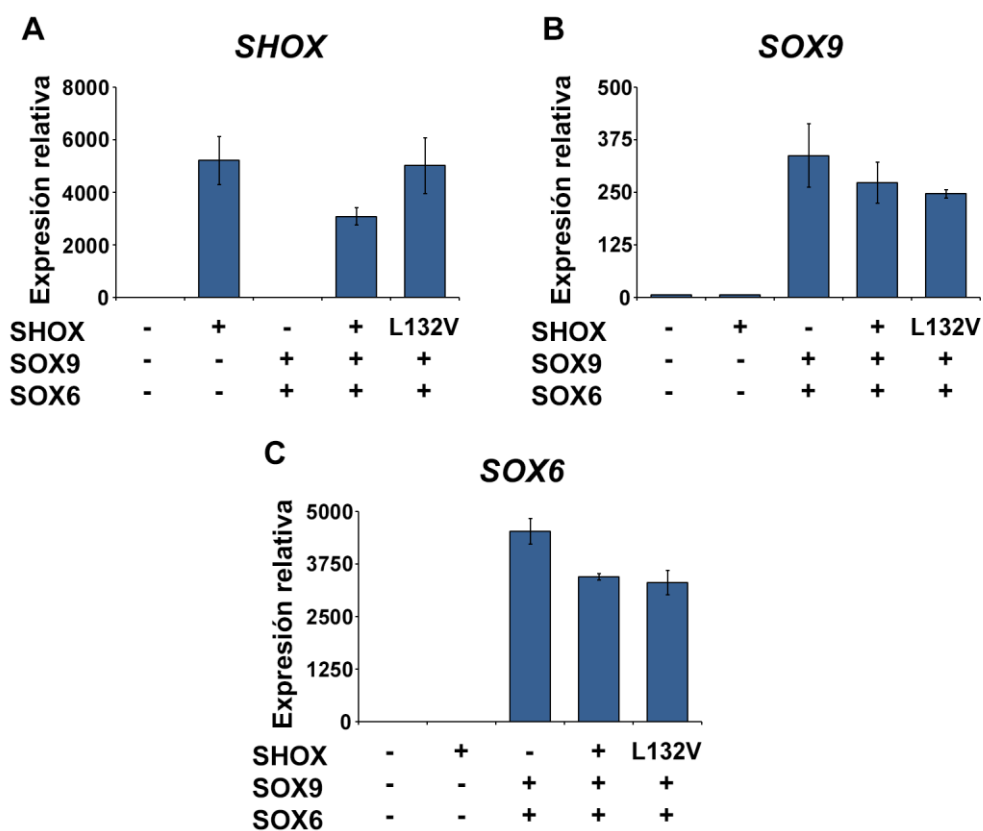


Figura 17. Confirmación de la sobreexpresión de *SHOX*, *SOX9* y *SOX6*. Comparación, mediante PCR cuantitativa, de los niveles de expresión de los genes *SHOX* (A), *SOX6* (B) y *SOX9* (C) entre células 10T1/2 de ratón transfectadas con distintas combinaciones de vectores de expresión (pcDNA3.1) de *SOX6*, *SOX9*, *SHOX* y su mutante p.L132V. Los valores de expresión relativa se han obtenido mediante el método de las curvas estándar y representan la media \pm DE de una réplica representativa de las tres realizadas. *SHOX*, *SOX6* y *SOX9* se sobreexpresaron correctamente.

Tabla 12. Características antropométricas y fenotípicas de cada probando portador de una variante en *NPR2* y sus familiares.

Variante/ Mutación de NPR-B	Miembro familiar	DLW/ TBI	Sexo (H/M)	Edad (Años)	Mutación/ Variante (Sí/No)	Medidas Antropométricas (DE)	Prop. o Des.**	Otras características clínicas
p.Ala164Gly	Probando 1	TBI	H	1,3	Sí	T: 72 (-2,5) E/T: ND TS/T: ND	Prop.	ND
	Madre		M	Adulto	No	A: 144 (-3,0) E/T: ND TS/T: ND	Prop.	ND
p.Asp256Tyr	Probando 2 (II.2)	DLW	M	6,6	Sí	T: 108 (-2,5) E/T: 1,00 TS/T: 0,52	Prop.	Cúbito valgo, hipertrofia muscular y epífisis con forma de cono.
	Hermano (II.1)		H	Adulto	Sí	T: 155 (-3,5) E/T: 1,04 TS/T: ND	Prop.	No disponible
	Padre (I.1)		H	Adulto	Sí	T: 157 (-2,9) E/T: 1,04 TS/T: 0,51	Prop.	Epífisis con forma de cono.
p.Thr421Met	Probando 3	DLW	H	18,5	Sí	T: 156 (-3,2) E/T: ND TS/T: ND	Des.	Antebrazos cortos. Fenotipo peculiar con rostro largo y estrecho.
p.Asn546Tyr	Probando 4	TBI	H	12,5	Sí	T: 128 (-2,8) E/T: 0,99 TS/T: 0,55	Prop.	Retraso en la edad ósea (1 año).
	Madre		M	Adulto	No	T: 148 (-2,4) E/T: ND TS/T: 0,57	Des.	ND
p.Asn546Tyr	Probando 5	DLW	H	10,3	Sí	T: 124 (-3,1) E/T: 0,94 TS/T: ND	Des.	Cúbito valgo e hipertrofia muscular.
	Padre		H	Adulto	ND	T: (3,1) E/T: ND TS/T: ND	ND	ND

Variante/ Mutación de NPR-B	Miembro familiar	DLW/ TBI	Sexo (H/M)	Edad (Años)	Mutación/ Variante (Sí/No)	Medidas Antropométricas (DE)	Prop. o Des.**	Otras características clínicas
p.Val548del	Probando 6 (II.1)	DLW	H	13,8	Sí	T: 140 (-2,9) E/T: 0,96 TS/T: 0,51	Des.	Curvatura del radio, acortamiento mesomélico de las extremidades, acortamiento del 4º metacarpo y retraso en la edad ósea (2 años).
	Padre (I.1)		H	Adulto	No	T: 168 (-1,5) E/T: ND TS/T: ND	ND	ND
	Madre (I.2)		M	Adulto	Sí	T: 146 (-2,7) E/T: ND TS/T: ND	ND	ND
p.Gly643Glu	Probando 7 (II.1)	DLW	M	9,9	Sí	T: 122 (-2,5) E/T: 0,93 TS/T: 0,55	Des.	ND
	Padre (I.1)		H	Adulto	Sí	T: 157 (-3,2) E/T: 1,00 TS/T: 0,53	Prop.	ND
	Madre (I.2)		M	Adulto	No	T: 152 (-1,8) E/T: 0,95 TS/T: 0,55	Des.	ND
p.Arg819Cys	Probando 8 (II.1)	DLW	H	10,2	Sí	T: 126 (-2,3) E/T: 0,95 TS/T: 0,54	Des.	Hipertrofia muscular.
	Madre (I.2)		M	Adulto	Sí	T: 144 (-3,0) E/T: 0,94 TS/T: 0,56	Des.	ND

Variante/ Mutación de NPR-B	Miembro familiar	DLW/ TBI	Sexo (H/M)	Edad (Años)	Mutación/ Variante (Sí/No)	Medidas Antropométricas (DE)	Prop. o Des.**	Otras características clínicas
p.Glu991Gly	Probando 9 (II.1)	DLW	M	6,4*	Sí	T: 107 (-2,3)* E/T: ND* TS/T: ND*	Prop.	Paladar hendido, acortamiento de la 5ª falange, hipertrofia muscular, malposición dental, epífisis en forma de cono.
	Hermano (II.2)		H	7,8	Sí	T: 120 (-2,3) E/T: 0,98 TS/T: 0,51	Prop.	Paladar hendido, acortamiento de la 5ª falange, hipertrofia muscular y retraso severo de la edad ósea (2 años).
	Hermana (II.3)		M	7,8	Sí	T: 124 (-0,7) E/T: 0,97 TS/T: 0,51	Prop.	Acortamiento del 4º y 5º metacarpo.
	Padre (I.1)		H	Adulto	No	T: 170 (-1,2) E/T: ND TS/T: ND	Prop.	ND
	Madre (I.2)		M	Adulto	Sí	T: 155 (-1,4) E/T: ND TS/T: ND	Prop.	Paladar hendido, curvatura del radio y espondilitis anquilosante.
p.Arg1020Trp	Probando 10 (II.1)	DLW	M	9,0	Sí	T: 124 (-1,5) E/T: 0,95 TS/T: ND	Des.	Acortamiento mesomélico de las extremidades, curvatura de las extremidades inferiores, extensión limitada de los codos, braquidactilia, especialmente del 5º dígito, frente aplanada, hipertelorismo y estrabismo, paladar hendido y malposición dental.
	Madre (I.2)		M	Adulto	ND	T: 155 (-1,1) E/T=0,96 TS/T: ND	Des.	Sordera.

* Datos de la paciente antes de empezar con el tratamiento de Hormona de Crecimiento recombinante humana (rhGH). ** Miembros proporcionados (prop.) o desproporcionados (des.). Medidas antropométricas: T: Talla, E/T: proporción Envergadura/ Talla y TS/T: proporción Talla Sentado/Talla. ND: no determina

Tabla 14. Características antropométricas y fenotípicas del probando con la variante p.Gly119Cys de *NPPC* y sus familiares.

Variante/ Mutación de <i>NPPC</i>	Miembro familiar	Mut. en <i>NPPC</i> (Sí/No)	Edad (Años)	Sexo (H/M)	Altura, cm (DE)	E/T	TS/T	Prop. o Des.**	Tamaño mano, cm (DE)	Otras características clínicas
p.Arg117Gly	Probando 11 (III.1)	Sí	13.5	M	145 (-2,3)	0,98	0,55	Prop.	16,5 (-3,7)	Pies y manos pequeñas, con acortamiento del 4º metacarpo, cubito y genu valgo, hipertrofia de las extremidades inferiores e hipertelorismo.
	Hermana (III.2)	No	11,5	M	147 (-0,4)	0,99	0,52	Prop.	15,5 (-1,4)	ND
	Padre (II.4)	No	Adulto	H	164 (-1,9)	1,05	0,53	Prop.	19,0 (-1,1)	Hipertelorismo, aspecto corpulento y manos anchas y cortas.
	Madre (II.5)	Sí	Adulto	M	149 (-2,6)	0,97	0,54	Prop.	16,0 (-4,5)	Manos y pies muy pequeños (Talla de pie: 34).
	Tía materna (II.6)	Sí	Adulto	M	146 (-2,9)	1,02	0,54	Prop.	15,0 (-6,0)	ND
	Tía materna (II.7)	No	Adulto	M	160 (-0,7)	ND	ND	ND	ND	ND
	Abuelo materno (I.3)	No	Adulto	H	147 (-4,8)*	1,06	0,55	Prop.	15,0 (-4,2)***	ND
	Abuela materna (I.4)	Sí	Adulto	M	138 (-4,3)*	1,04	0,52	Prop.	15,5 (-5,2)	Manos pequeñas
p.Gly119Cys	Probando 12 (II.2)	No	17	H	160 (-2,1)	1,05	0,51	Prop.	18,4 (-1,3)	Sigue creciendo y presenta retraso en el crecimiento pero está siendo tratado con testosterona desde los 14,6 años para inducir su pubertad.
	Hermana (II.1)	Sí	Adulto	M	145 (-2,8)	1,00	0,52	Prop.	17,2 (-2,1)	Manos pequeñas
	Padre (I.1)	Sí	Adulto	H	157 (-2,8)	0,98	0,52	Prop.	17,7 (-2,1)	Manos pequeñas
	Madre (I.2)	No	Adulto	M	158 (-0,8)	ND	ND	Prop.	ND	ND

Mut.: mutación.* La talla es tan reducida debido a que esta influenciada por su edad. ** Miembros proporcionados (prop.) o desproporcionados (des.). *** Tiene artritis, por lo tanto la medida del tamaño de su mano no es exacta. Medidas antropométricas: T: Talla, E/T: proporción Envergadura/ Talla y TS/T: proporción Talla Sentado/Talla. ND: no determinado.

Anexo II

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral el doctorando ha participado en las siguientes publicaciones:

Hisado-Oliva A, Garre-Vázquez AI, Santaolalla-Caballero F, Belinchón A, Barreda-Bonis AC, Vasques GA, Ramirez J, Luzuriaga C, Carlone G, González-Casado I, Benito-Sanz S, Jorge AA, Campos-Barros A, Heath KE. Heterozygous NPR2 Mutations Cause Disproportionate Short Stature, Similar to Léri-Weill Dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Aug;100(8):E1133-42. doi: 10.1210/jc.2015-1612. Epub 2015 Jun 15.

Aza-Carmona M, Barca-Tierno V, **Hisado-Oliva A**, Belinchón A, Gorbenko-del Blanco D, Rodríguez JI, Benito-Sanz S, Campos-Barros A, Heath KE. NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development. *PLoS One*. 2014 Jan 8;9(1):e83104. doi: 10.1371/journal.pone.0083104. eCollection 2014.

Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, **Hisado-Oliva A**, Belinchón A, Benito-Sanz S, Rodríguez JI, Argente J, Campos-Barros A, Scambler PJ, Heath KE. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 15;20(8):1547-59. doi: 10.1093/hmg/ddr032. Epub 2011 Jan 24.

Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, **Hisado-Oliva A**, Romanelli V, Rosell J, Aragonés A, Caimari M, Argente J, Ross JL, Zinn AR, Gracia R, Lapunzina P, Campos-Barros A, Heath KE. Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Feb;96(2):E404-12. doi: 10.1210/jc.2010-1689. Epub 2010 Dec 8.

Heterozygous *NPR2* mutations cause disproportionate short stature, similar to Léri-Weill dyschondrosteosis

Alfonso Hisado-Oliva^{1,2,3}, Ana I. Garre-Vázquez¹, Fabiola Santaolalla-Caballero¹, Alberta Belinchón^{1,2,3}, Ana C. Barreda-Bonis^{3,4}, Gabriela A Vasques⁵, Joaquin Ramirez⁶, Cristina Luzuriaga⁷, Gianni Carlone⁸, Isabel González-Casado^{3,4}, Sara Benito-Sanz^{1,2,3}, Alexander A. Jorge⁵, Angel Campos-Barros^{1,2}, Karen E. Heath^{1,2,3†}

1. Institute of Medical & Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain.; 2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER, U753), Instituto Carlos III, Madrid, Spain.; 3. Multidisciplinary Skeletal dysplasia Unit (UMDE), Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.; 4. Dept. of Pediatric Endocrinology, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.; 5. Unidade de Endocrinologia Genetica, Laboratorio de Endocrinologia Celular e Molecular LIM-25, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.; 6. Dept. of Endocrinology & Nutrition, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain.; 7. Dept. of Pediatric Endocrinology, Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain.; 8. Dept of Pediatric Endocrinology, Hospital de Plasencia, Cáceres, Spain

Context: *SHOX* mutations have been detected in ~70% of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and ~2.5% of idiopathic short stature (ISS) cases, suggesting the implication of other genes or loci. The recent identification of *NPR2* mutations in ISS suggested that *NPR2* mutations may also be involved in disproportionate short stature.

Objective: To investigate if *NPR2* mutations can account for a proportion of the cases referred for LWD and ISS in whom no *SHOX* mutation was detected.

Patients and Methods: We undertook *NPR2* mutation screening in 173 individuals referred for suspected LWD and 95 for ISS, with no known defect in *SHOX* or its enhancers. Intracellular localization and CNP-dependent guanylate cyclase activity were determined for the identified *NPR2* variants.

Results: Eight *NPR2* variants were identified in nine individuals, seven referred for suspected LWD and two for ISS. Six were demonstrated to affect NPR-B cell trafficking and/or its ability to synthesize cGMP under response to CNP/BNP stimulation. All pathogenic mutations were detected in the suspected LWD referral group (~3%). Interestingly, one of these patients is currently being treated with rhGH, and in contrast to previous reports is showing a positive response to the treatment.

Conclusions: *NPR2* mutations account for ~3% of patients with disproportionate short stature and/or clinical or radiographic indicators of *SHOX* deficiency and in whom no *SHOX* defect has been identified. However, no patient has yet presented with Madelung deformity. Thus, *NPR2* should be screened in the *SHOX* negative LWD referrals.

Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127 300) is a skeletal dysplasia characterized by, disproportionate short stature due to mesomelic limb shortening and the

characteristic Madelung deformity, the bowing and shortening of the radius, the distal dislocation of the ulna and pyramidal configuration of the carpal bones. Other minor

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received March 9, 2015. Accepted June 10, 2015.

Abbreviations:

abnormalities may include high-arched palate, *cubitus valgus*, short fourth metacarpal, micrognathia and muscular hypertrophy (1). Most LWD cases are caused by heterozygous mutations in *SHOX* (Short stature homeobox-containing gene) or its regulatory regions, located on the pseudoautosomal region 1 (PAR1) (2–7). Heterozygous *SHOX* mutations are also observed in a small proportion (~2%–5%) of patients with idiopathic short stature (ISS, MIM 300 582) (1, 8, 9). The penetrance of *SHOX* haploinsufficiency is high, but its clinical expression is very variable with some LWD individuals having heights within the normal range and others lacking mesomelic shortening of the limbs or Madelung deformity (10). The clinical characteristics become more pronounced with age and are often more severe in females. Auxological analysis of the body proportions, the presence of minor abnormalities, and subtle radiographic signs can often be hard to detect, thereby genetic analysis is required for confirmation.

Defects in both copies of *SHOX* are associated with the more severe skeletal dysplasia, Langer mesomelic dysplasia (LMD, MIM 249 700), with disproportionate extreme short stature (–5.5 to –7.2 SDS) and marked mesomelic and rhizomelic limb shortening (11–14).

As in the case of *SHOX*, homozygous mutations in *NPR2* (Natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B) cause a severe dysplasia: Acromesomelic dysplasia, type Maroteaux (AMDM, MIM 602 875) which is phenotypically similar to LMD in that patients have severe short stature (<–5 SDS in adults), shortening of the extremities, bowing of the forearm and shortening and widening of metacarpals and phalanges (15, 16). Furthermore, the mouse model carrying a *Npr2* homozygous mutation, also exhibited disproportionate dwarfism, short limbs, especially short bowed radius, short tail and domed skull (17–19). Many *NPR2* mutations reported to date, were shown to cause the retention of NPR-B in the endoplasmic reticulum (ER), promoting a reduced enzymatic activity due to impaired cellular trafficking (20). Interestingly, heterozygous *NPR2* mutation carrier parents were suggested to be shorter (21), with heights 5.7 cm shorter than population matched controls (16). This was subsequently confirmed in a large multigenerational family with a mean –1.4 SDS height reduction in 16 carriers as compared to 23 noncarriers (22). However, no difference was observed for the sitting height to height (SH/H) ratio between the *NPR2* mutation carriers and noncarriers (22). More recently, *NPR2* heterozygous missense mutations have been also identified in 2%–6% of ISS patients (23–25) suggesting that *NPR2* mutations may account for a significant proportion of the short stature population.

NPR2 codes for NPR-B, a transmembrane receptor re-

lated with endochondral bone growth (16, 22). NPR-B presents a modular structure: 1) An extracellular ligand-binding domain that is able to bind to the natriuretic peptides CNP (Natriuretic peptide precursor C), BNP (Brain natriuretic peptide), and ANP (Natriuretic peptide A); 2) a transmembrane region; 3) an intracellular kinase homology domain, and 4) a carboxyl-terminal guanylate cyclase domain which, under response to natriuretic peptide stimulation, produces cyclic guanosine monophosphate (cGMP) from guanosine triphosphate (GTP) (26). Natriuretic peptides participate in the regulation of endochondral bone ossification (CNP, BNP) and cardiovascular functions (BNP, ANP, CNP), binding to NPR-B with different efficiencies (CNP \gg ANP \geq BNP) (27, 28).

Although mutations in *SHOX* or its enhancers have been detected in ~70% of LWD cases (8, 29, 30), the molecular defect in the remaining ~30% is unknown, suggesting that other genes or *loci* could be implicated in this syndrome. In this study, we set out to determine if heterozygous *NPR2* mutations could account for a proportion of patients referred for possible LWD and in whom no mutation was detected in *SHOX* or its enhancer regions. Similarly we studied a cohort of ISS patients with no *SHOX* defect, to investigate if *NPR2* mutations are detected in LWD, ISS or both pathologies. A total of 173 patients with suspected LWD and 95 with ISS were screened for mutations in *NPR2*. Functional studies were subsequently performed for the detected variants.

Materials and Methods

Cohort

A total of 173 patients with suspected LWD and 95 patients with ISS, with no detected alteration in *SHOX* or its regulatory regions were included in the study. A suspected LWD diagnosis included two or more of the following features: 1) short stature < –2 SDS (31); 2) Madelung deformity; 3) mesomelic shortening of the arms, determined visually; 4) presence of one or more secondary clinical characteristics of *SHOX* deficiency, as described previously (1). Armspan/Height (A/H) and SH/H ratios were classified as abnormal if < 0.965 and > 0.555, respectively, according to phenotyping scoring data determined for *SHOX* deficiency in 1608 unrelated individuals (1). ISS was defined as a height <–2 SDS with normal GH or IGF levels and proportionate growth. A summary of the sex, age, anthropometric and clinical details of the two clinical cohorts is shown in Supplemental Table 1. All subjects had been extensively analyzed for mutations in *SHOX* or its enhancers using MLPA (P018E1/F1/G1, MRC Holland, The Netherlands), self-designed MLPA assays, High Resolution Melting (HRM) and sequencing (3, 4, 29, 32). All participants provided informed consent for the performed studies and ethical approval was obtained from the respective institutions. Genomic DNA was isolated from peripheral blood (Blood kit, QIAGEN, Valencia, CA or Chemagic

DNA extraction special, Chemagen, Perkin Elmer Inc, Germany).

NPR2 mutation screening

The screening of the coding sequences and intron/exon boundaries of *NPR2* (NM 003995.3) was performed using HRM or Next Generation Sequencing (NGS). Primers were designed with the help of Oligo v.6 software (Molecular Biology Insights, Inc, Cascade, CO) and SNPCheck V3 (<https://ngl.manchester.ac.uk/SNPCheckV3/snpcheck.htm>). PCR conditions are available in Supplemental Table 2. HRM was performed using a LightScanner 96 (BioFire Defense, Salt Lake City, UT). All samples with an abnormal melting curve were subsequently sequenced using the BigDye Terminator V3.1 kit (Life Technologies, Thermo Scientific Inc, Germany) and run on an ABI3730XL Sequencer (Applied Biosystems Foster City, CA). The NGS approach consisted of a custom designed skeletal dysplasia panel (SkeletalSeq.V3) of 315 genes/regions using SeqCap EZ library enrichment (Roche Nimblegen, Madison, WI) and run on a MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA). All variants were confirmed by direct sequencing, as was family testing.

In silico analysis

Conservation and pathogenicity prediction analysis of the identified *NPR2* variants was carried out using Alamut V2.6–1 software (Interactive Biosoftware, France). Population frequencies of the detected variants were assessed using the Exome Aggregation Consortium (ExAC) data (<http://exac.broadinstitute.org/>).

Cell culture

COS-7 and human osteosarcoma (U2OS) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) at 37°C in 5% CO₂. Cells were transfected using FuGene 6 (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's instructions.

Plasmid construction

The HA-tagged *NPR-B* wild-type and p.Arg110Cys mutant expression vectors (33) were kindly donated by Dr. Amano and Dr. Hasegawa (Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan). The HA tagged expression vectors containing the detected *NPR-B* mutants were generated by site-directed mutagenesis (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's recommendations. Mutagenesis primers can be found in Supplemental Table 3. All expression vectors were verified by sequencing.

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was undertaken as previously described (34). Basically, U2OS cells were transiently cotransfected with pHA-*NPR-B* wild-type or mutants and the endoplasmic reticulum marker pRED-Calreticulin (*CALR*, Origene Technologies Inc, Rockville, MD) expression vector. Anti-HA mouse monoclonal (Sigma-Aldrich, San Louis, MO) and Alexa fluor 488 goat antimouse (Life Technologies), both diluted at 1/2000, were used as primary and secondary antibodies, respectively. Cells were counterstained with diamino-2-phenylindole (DAPI,

Sigma-Aldrich) and mounted with DePeX mounting medium (BDH, Merck Chemicals Ltd, UK). *NPR-B*, *CALR* and DAPI intracellular localizations were visualized using a Leica DM5500 B fluorescent microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany). Two biological replicates were undertaken.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA assays were carried out as previously described with a few modifications (23). COS-7 cells were seeded on 12-well plates. After 24 hours, cells were transiently transfected with pHA-*NPR-B* wild-type (WT), *NPR-B* mutants or empty vector (EV). After 48 hours post-transfection, cells were incubated with 100 nM of CNP-22 (Bachem, Switzerland) in DMEM for 20 minutes. Subsequently 0.1M HCl was added to stop endogenous phosphodiesterase activity, stabilize the released cGMP and lyse the cells. Cell lysates were centrifuged at 600 g for 10 minutes and the supernatants were isolated. The cGMP levels in the supernatant were measured using the cGMP Complete ELISA kit (ENZO Life Sciences Inc, Farmingdale, NY). Each mutant was analyzed in triplicate and at least two biological replicates were performed. Student's t-tests, using SPSS v15.0 for Windows, were carried out to compare the differences between WT and mutants. A p-value of < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

NPR2 mutation screening

We analyzed the coding and intron-exon sequences of *NPR2* in 173 patients with suspected LWD and 95 with ISS with no known *SHOX*/*PAR1* defect. Eight variants, seven missense and one in frame codon deletion, were detected in nine individuals, seven LWD referrals and two ISS (Table 1). Six of the detected variants have not been previously described in AMDM or ISS patients while the p.Arg819Cys mutation has been previously reported as a pathogenic variant (23). The p.Asp256Tyr, p.Val548del, p.Glu991Gly and p.Arg1020Trp variants have not been observed in the large population exome studies (ExAC) while the other four have been observed at extremely low allelic frequencies (Table 1). The conservation of the affected amino acids and the pathogenicity predictions are shown in Table 1. Cosegregation studies were undertaken where possible (n = 5, Supplemental Figure 1). The p.Asp256Tyr (Proband 2), p.Val448del (Proband 6), p.Arg819Cys (Proband 7) and p.Glu991Gly (Proband 8) variants cosegregated with the phenotype. The cosegregation analysis of the p.Asn546Tyr (Proband 4) variant was inconclusive, whereas the p.Ala164Gly variant (Proband 1) did not cosegregate with the short stature phenotype. The phenotypic characteristics of the probands with *NPR2* variants and their relatives are shown in Table 2.

Table 1. Eight *NPR2* variants observed in nine individuals referred for suspected LWD ($n = 173$) and ISS ($n = 95$), all with no *SHOX* defect. The protein domain, cosegregation analysis and pathogenicity predictions are indicated for each variant.

Proband	cDNA	Exon	Amino acid	Domain	Country	Cosegregation [†]	SIFT	Mutation tester	Polyphen
1 (ISS)	c.491C>G	1	p.Ala164Gly	Ligand binding	Brazil	No	0.05 Tol.	0.925 Polymorphism	0.065 Benign
2 (LWD)	c.766G>T	2	p.Asp256Tyr	Ligand binding	Spain	Yes	0 Del.	1 Disease-causing	0.962 Damaging
3 (LWD)	c.1262C>T	6	p.Thr421Met	Ligand binding	Spain	ND	0 Del.	0.883 Disease-causing	0.090 Benign
4 (LWD)	c.1636A>T	10	p.Asn546Tyr	Kinase homology	Brazil	NI	0 Del.	0.999 Disease-causing	0.885 Damaging
5 (ISS)	c.1636A>T	10	p.Asn546Tyr	Kinase homology	Spain	ND	0 Del.	0.999 Disease-causing	0.885 Damaging
6 (LWD)	c.1641 1643del	10	p.Val548del	Kinase homology	Spain	Yes	-	-	-
7 (LWD)	c.2455C>T*	16	p.Arg819Cys	-	Spain	Yes	0 Del.	1 Disease-causing	1.000 Damaging
8 (LWD)	c.2972A>G	20	p.Glu991Gly	Guanylate cyclase	Spain	Yes	0 Del.	1 Disease-causing	1.000 Damaging
9 (LWD)	c.3058C>T	21	p.Arg1020Trp	Guanylate cyclase	Spain	ND	0 Del.	1 Disease-causing	1.000 Damaging

All variants were localized at highly conserved amino acids. *This mutation has been previously described in one Brazilian family and its pathogenicity has been previously demonstrated (23). †Cosegregation details are shown in Supp Fig 1. ND: Not determined; NI: non-informative, Tol: tolerated, Del: deleterious.

Frequencies of the variant in the large sequencing project data (ExAC: 60 706 European (non-Finnish and Finnish), African, Asian and Latino individuals). Variants c.766G>T, c.1636A>T, c.2972A>G and c.3058C>T have not been observed. Variant c.491C>G (rs62637657) has been observed in 3/66 522 European (Non-Finnish) and 1/10 378 African American chromosomes (total 4/121 138). Variant c.1262C>T (rs140361919) has been observed in 5/66 712 European Non-Finnish, 4/10 402 African and 1/16 510 Asian chromosomes (Total 10/121 322). Variant c.2455C>T has been observed in 2/66 740 European non-Finnish and 1/11 574 Latino chromosomes (total of all studied populations 3/121 406).

Functional characterization of NPR-B variants

In order to functionally evaluate the pathogenicity of the identified variants, we first determined if they affected NPR-B cell trafficking. For this purpose, we transiently transfected the wild type and variant cDNAs and subcloned them into an HA-expression vector in human osteosarcoma cells (U2OS). Their intracellular localization was determined by immunocytochemistry using antibodies against NPR-B and the ER marker, CALR. The NPR-B variants p.Ala164Gly, p.Asn546Tyr, p.Val548del and p.Glu991Gly were located at the cell surface while three mutants, p.Asp256Tyr, p.Thr421Met and p.Arg1020Trp, colocalized with the ER (Figure 1).

Secondly, we analyzed the receptor activity of all identified variants by assessing the CNP-dependent guanylate cyclase activity. Four of the analyzed mutants: p.Asp256Tyr, p.Val548del, p.Glu991Gly and p.Arg1020Trp showed a total absence of cGMP synthesis, similar to that of unstimulated wild type and the control mutant p.Arg110Cys (Figure 2A), while p.Thr421Met showed a 61% activity decrease. The p.Ala164Gly and p.Asn546Tyr mutants only showed moderate reductions in cGMP synthesis, 19% and 31%, respectively (Figure 2A). As we had detected the variants in a heterozygous state, we also analyzed if they had a dominant negative effect by cotransfecting each mutant with NPR-B wild-type, at a ratio 1:1. We observed a highly significant reduction of CNP-stimulated cGMP synthesis as compared to cells cotransfected with wild-type and empty vector

with six of the NPR-B mutants tested, indicating a dominant negative effect. However, the p.Ala164Gly and p.Asn546Tyr mutants did not show a significant reduction when cotransfected with the wild type (Figure 2B), suggesting that they did not have a dominant negative effect in the heterozygous state. Thus, functional analysis confirmed that six of the *NPR2* mutations, including the previously reported mutation, as pathogenic mutations (Table 3).

Discussion

A total of eight *NPR2* variants were identified in nine individuals, seven of the 173 patients referred for suspected LWD and two from the cohort of 95 ISS, all of which had been previously excluded for *SHOX*/PAR1 defects. First, the pathogenicity of the identified *NPR2* variants was assessed using *in silico* prediction tools. Seven of the eight variants were predicted to be pathogenic while only the p.Ala164Gly mutation was classified as non-pathogenic. Only one of the identified variants, p.Arg819Cys, had been previously reported in an ISS patient, and functionally demonstrated to be pathogenic (23). Therefore, functional studies were undertaken for the characterization of the additional seven *NPR2* variants identified.

Six of the *NPR2* variants were confirmed to be pathogenic mutations, three were shown to cause the retention

Table 2. Anthropometric and phenotypic characteristics of the probands and their family members.

NPR-B Mutation/ Variant	Family member	Referral	Gender	Age	Mutation/ Variant	Anthropometric measurements (SDS)	Dis. or Prop.	Other clinical characteristics
		LWD/ ISS	(M/F)	(y)	(Y/N)			
p.Ala164Gly	Proband 1	ISS	M	1.3	Y	H: 72 (-2.5) A/H: ND SH/H: ND	Prop	ND
	Mother		F	Adult	N	H: 144 (-3.0) A/H: ND SH/H: ND	Prop	ND
p.Asp256Tyr	Proband 2	LWD	M	6.6	Y	H: 108 (-2.5) A/H: 1.00 SH/H: 0.52	Prop	High-arched palate, cubitus valgus, muscular hypertrophy cone-shaped epiphysis.
	Brother		M	Adult	Y	H: 155 (-3.5) A/H: 1.04 SH/H: ND	ND	ND
	Father		M	Adult	Y	H: 157 (-2.9) A/H: 1.04 SH/H: 0.51	ND	Cone-shaped epiphysis.
p.Thr421Met	Proband 3	LWD	M	18.5	Y	H: 156 (-3.2) A/H: ND SH/H: ND	Dis	Short forearms. Peculiar phenotype with long narrow face.
p.Asn546Tyr	Proband 4	LWD	M	12.5	Y	H: 128 (-2.8) A/H: 0.99 SH/H: 0.56	Prop	Delayed bone age (1 yr).
	Mother		F	Adult	N	H: 148 (-2.4) A/H: ND SH/H: 0.57	Dis	ND
p.Asn546Tyr	Proband 5	ISS	M	10.3	Y	H: 124 (-3.1) A/H: 0.94 SH/H: ND	Dis	Cubitus valgus and muscular hypertrophy.
	Father		M	Adult	ND	H: (3.1) A/H: ND SH/H: ND	ND	ND
p.Val548del	Proband6 (II.1)	LWD	M	13.8	Y	H: 140 (-2.9) A/H: 0.973 SH/H: 0.51	Dis	Bowing of radius, mesomelic shortening of limbs, short 4th metacarpal & delayed bone age (2y).
	Father (I.1)		M	Adult	N	H: 168 (-1.5) A/H: ND SH/H: ND	ND	ND
	Mother (I.2)		F	Adult	Y	H: 145.6 (-2.7) A/H: ND SH/H: ND	ND	ND
p.Arg819Cys	Proband 7	LWD	M	10.2	Y	H: 126 (-2.3) A/H: 0.95 SH/H: 0.54	Dis	Muscular hypertrophy.
	Mother		F	Adult	Y	H: 144 (-3.0) A/H: 0.94 SH/H: 0.56	Dis	ND
p.Glu991Gly	Proband 8 (II.1)	LWD	F	6.4*	Y	H: 107 (-2.3)* A/H: ND* SH/H: ND*	Prop	High-arched palate, short 5th phalange, muscular hypertrophy, dental malpositioning, cone-shaped epiphysis.
	Brother (II.2)		M	7.8	Y	H: 120 (-2.3) A/H: 0.98 SH/H: 0.51	Prop	High-arched palate, short 5th phalange, muscular hypertrophy and severely delayed bone age (2 yr).
	Sister (II.3)		F	6.8	Y	H: 123.8 (-0.7) A/H: 0.973 SH/H: 0.51	Prop	Short 4–5th metacarpals.
	Father (I.1)		M	Adult	N	H: 169.8 (-1.2) A/H: ND SH/H: ND	Prop	ND
	Mother (I.2)		F	Adult	Y	H: 155.5 (-1.4) A/H: ND SH/H: ND	Prop	High arched palate, bowing of radius. Ankylosing spondylitis.
	Proband 9	LWD	F	9.0	Y	H: 124.5 (-1.5) A/H: 0.956 SH/H: ND	Dis	Mesomelic limb shortening, lower leg bowing, limited extension of the elbows, brachydactyly, especially of 5th digit, flattened forehead, hypertelorism and strabismus, high- arched palate, dental malpositioning.
p.Arg1020Trp	Mother		F	Adult	ND	H:155 (-1.1) A/H = 0.965 SH/H: ND	Dis	Deafness

LWD: Léri-Weill dyschondrosteosis, ISS: Idiopathic short stature; Y:Yes; N: No; ND: Not documented; H: Height; A/H: armspan length; SH: Sitting height; Dis: disproportional growth; Prop: proporcional growth. * Data at 6.4 yr, prior to GH treatment. Further data is available in supplemental data.

of NPR-B in the ER, resulting in a reduced enzymatic guanylate cyclase activity, due to impaired cellular trafficking. However, the p.Thr421Met mutant behaved differently to the other two ER retained mutants, showing

39% of wild type cGMP activity, suggesting that some residual trafficking may still exist, despite not being observed in the immunochemical assay. Three *NPR2* mutations did not affect the ability to translocate to the plasma

membrane but showed reduced cGMP synthesis. All six mutations were shown to have a dominant negative effect over the wild type form. Only three NPR-B mutants forms

showed impaired cellular trafficking, a frequency similar to that previously observed in short stature individuals (3/5), while very different to that reported in AMDM patients, in whom most *NPR2* missense mutants (11/12) were retained in the ER and showed reduced enzymatic activity (20, 23, 24). Although the cellular localization has only been studied in a total of 23 NPR-B mutants so far (20, 23, 24), there is no apparent correlation between the domain location of the mutations and their ability to trans-

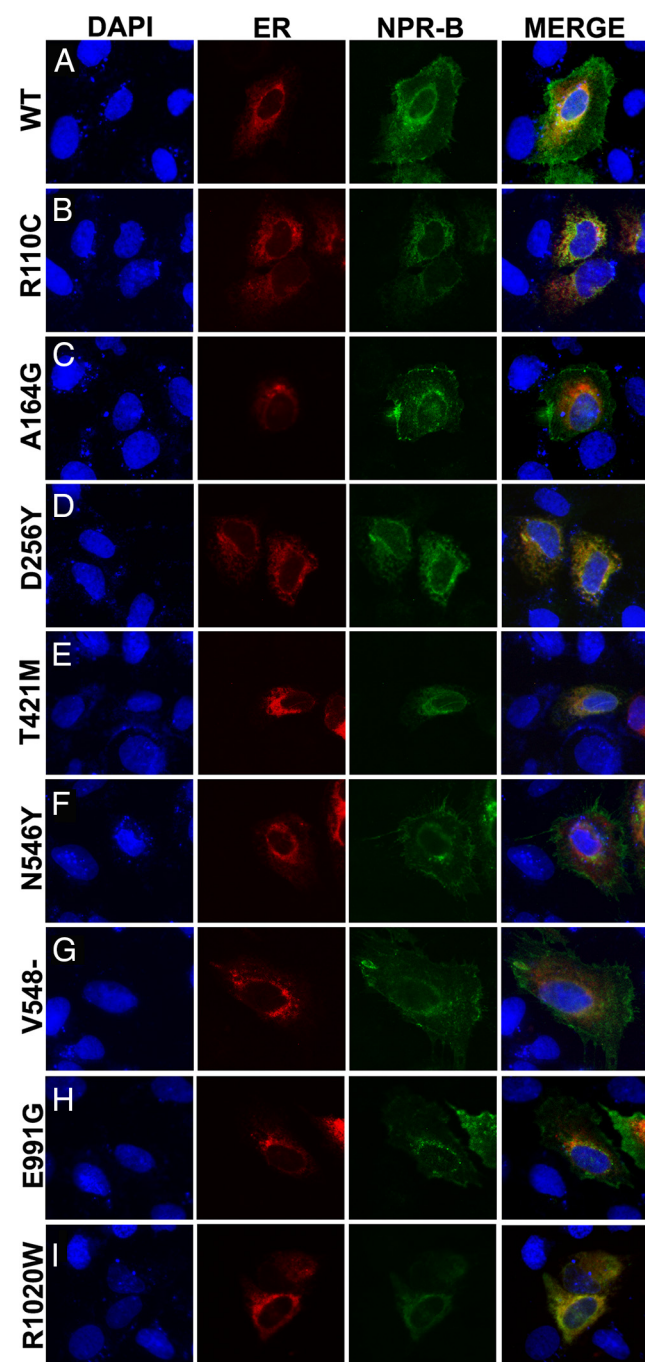


Figure 1. Intracellular localization of the NPR-B mutants. U2OS cells were transfected with NPR-B WT (A), p.Arg110C (R110C) mutant (B) as an ER retention control (24) or each mutant identified in our cohort (C-I). Intracellular localization of NPR-B (green), ER marker CALR (red) and nuclei with DAPI (blue). The three fluorescent images are merged in the fourth column. Images are at 20x magnification. The NPR-B mutants: p.Ala164Gly (A164G), p.Asn546Tyr (N546Y), p.Val548del (V548del) and p.Glu991Gly (E991G) all showed cell surface localization while the p.Asp256Tyr (N256Y), p.Thr421Met (T421M) and p.Arg1020Trp (R1020W) mutants were retained in the ER. Identical results were obtained in two independent experiments.

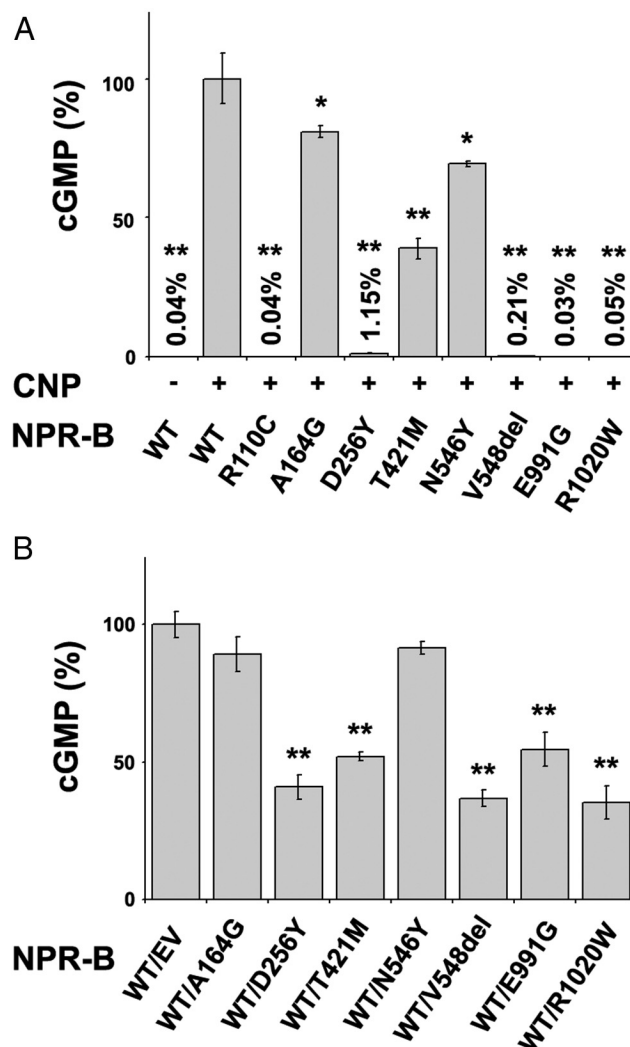


Figure 2. CNP-dependent guanylate cyclase activity of wild type NPR-B and mutants. A, Guanylate cyclase activity of COS-7 cells transfected with NPR-B wild-type (WT) or mutants (A164G, D256Y, T421M, N546Y, V548del, E991G and R1020W) and the positive control (R110C), stimulated with CNP. CNP-dependent receptor activity is expressed as a percentage relative to CNP-stimulated NPR2-B WT. All mutants showed a reduction in CNP-dependent cGMP synthesis, to different degrees. B, cGMP activity of COS-7 cells transfected with a 1:1 ratio of NPR-B wild-type and empty vector (EV) or mutants, and treated with CNP. CNP-stimulated cGMP values are expressed as a percentage relative to CNP-stimulated WT/EV. Five mutants showed a dominant negative effect. Bars are standard deviations of the mean. Each assay was undertaken in triplicate and two biological replicates were performed. Significant p-values are indicated with asterisks (* $P < .05$ and ** $P < .01$).

Table 3. Functional characterization of the NPR-B mutants. Cellular localization studies were undertaken using immunocytochemistry in U2OS cells and cGMP synthesis capacity was assessed by ELISA.

NPR-B mutant	Retained in the ER	cGMP synthesis (% of WT)	Dominant negative effect on cGMP synthesis	Pathogenic summary
A164G	-	81	-	Non-pathogenic
D256Y	+	1.15	+	Pathogenic
T421 M	+	39	+	Pathogenic
N546Y	-	69	-	Non-pathogenic
V548del	-	0.20	+	Pathogenic
R819C*	-	~2	+	Pathogenic
E991G	-	0.03	+	Pathogenic
R1020W	+	0.05	+	Pathogenic

* Functional studies previously reported (23).

locate to the plasma membrane, whereas all mutants caused a reduced capacity to synthesize cGMP.

The remaining two NPR-B variants, p.Ala164Gly and p.Asn546Tyr, identified in two ISS patients, did not show any dominant negative effect when cotransfected with the wild type construct. Both were transported to the cell membrane and showed a milder reduction of cGMP synthesis in the homozygous state. This emphasizes the utility of the cotransfection assays for the functional assessment of the dominant negative effect of novel NPR-B variants on cGMP synthesis capacity, emulating the heterozygous state. Moreover, cosegregation analysis did not confirm cosegregation of the p.Ala164Gly variant with the short stature phenotype within the examined family, nor in a second family, in which this variant was recently reported as a VOS (25). Hence, in contrast to previous studies (23, 24), we did not find any *NPR2* pathogenic defects in patients classified as ISS, probably because we used a more stringent definition of ISS, according to Cohen et al, 2006 (ref 35), so as to determine which patient should be tested for *NPR2* mutations.

The previously reported p.Arg819Cys mutation (23) was also identified in proband 7. At age 10, he had a height SDS of -2.3, (A/H) ratio of 0.95, SH/H ratio of 0.54 and muscle hypertrophy, ie, disproportionate short stature and shortening of the upper limbs. His carrier mother also has disproportional short stature (-3.0 SDS), and A/H and SH/H ratios of 0.94 and 0.56, respectively, indicative of shortening of the upper and lower limbs. The previously reported Brazilian patient, aged 17, had proportional short stature (height -2.4 SDS, SH/H 1.3 SDS) and shortened metacarpals while his mother had normal height (-1.7 SDS) but had altered SH/H ratio of 0.57, suggesting shortening of the lower limbs. Thus, the phenotypic expression of the p.Arg819Cys mutation is highly variable in the two examined families.

Interestingly, probands 2 and 8 presented with cone-shaped epiphyses, probands 8 and 9 with short phalanges and proband 8 also presented with a broad forehead, all of

which are clinical and radiological features described in patients with homozygous *NPR2* mutations (AMDM). Dental malpositioning was also described in probands 8 and 9, a feature previously not reported in patients with *NPR2* or *SHOX* mutations, ie, expanding the phenotypic spectrum of clinical features associated with *NPR2* mutations, though the implication of other factors is not excluded.

Hence, in this study, disproportionate short stature and/or phenotypic or radiographic indicators of *SHOX* deficiency were observed in all individuals with pathogenic *NPR2* mutations. This observation is not surprising since AMDM patients with *NPR2* homozygous mutations have severe disproportional short stature. Nevertheless, due to the high clinical heterogeneity observed in individuals with *SHOX* haploinsufficiency, it is quite understandable why these patients were referred as suspected LWD cases. Moreover, previous reports have shown that *SHOX* activates the *NPPB* promoter causing an increase in BNP (36), which may either directly influence NPR-B signaling or indirectly increase local CNP levels by saturating the NPR-C receptor. *SHOX* also activates aggrecan (*ACAN*) and *FGFR3* expression in human U2OS cells (37, 38) and *Col2A1* and *ACAN* in chicken micromasses (39) while down regulating *FGFR3* in chicken micromasses (38). Likewise, CNP enhances the synthesis of collagens (*Col2A1*) and proteoglycans (aggrecan), and influences cell proliferation, indicating a switch from proliferative to differentiated and hypertrophic chondrocytes, mediated by NPR-B (40). Therefore, *SHOX* and NPR-B and their downstream targets appear to be implicated in common growth pathways, which could explain why similar phenotypes are observed in individuals with *SHOX* and *NPR2* mutations.

Interestingly, none of the patients with *NPR2* mutations presented to date with the Madelung deformity, the most characteristic abnormality of LWD. This absence is a phenotypic feature which may be helpful for the differential diagnosis of disproportionate short stature caused

by autosomic dominant *NPR2* mutations. Nevertheless, we have to keep in mind that Madelung deformity may not be observed before 6 years old (41), although the condition can become apparent earlier in some cases. Therefore, we should wait for the prepubertal patients with *NPR2* mutations, to complete their puberty in order to definitely confirm the absence of the Madelung deformity. For now, our opinion is that these patients have phenotypic characteristics of the heterozygous form of AMDM, which is similar to that observed in many LWD individuals but it cannot be classified as LWD, as no individual has Madelung deformity.

Recombinant human growth hormone (hGH) (rhGH) is indicated for patients with *SHOX* haploinsufficiency. Improvements in height (+1.3 SDS) was observed in most individuals and 57% of them achieved a final height > -2 SDS (42). In contrast, few patients with *NPR2* mutations have been treated with rhGH, showing no or mild improvements on height (23–25). An initial good response observed in proband 8 (Supplemental Figure 2) suggests that rhGH treatment may be beneficial for patients with heterozygous *NPR2* mutations if the treatment is started at an early age. Nevertheless, larger prospective studies will be necessary to confirm this.

In summary, in our study 6/173 (~3%) suspected LWD referrals were found to have a heterozygous mutation in *NPR2* while no mutation was found in the ISS cohort (n = 95). Functional analysis of the identified pathogenic mutations demonstrated a dominant negative effect on the CNP-dependent guanylate cyclase activity, resulting in a decreased cGMP synthesis, as the likely molecular mechanism implicated in the etiology of disproportionate short stature. Hence, *NPR2* mutation screening is recommended in LWD suspected individuals without Madelung deformity in whom no alteration was detected in *SHOX* or its enhancers.

Acknowledgments

We would like to thank the INGEMM Sequencing Core for the Sanger sequencing and the Bioinformatic Unit for help with the NGS data analysis.

Address all correspondence and requests for reprints to: [†]Karen Heath, PhD, Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Pº Castellana 261, 28 046 Madrid, Spain, Tel: +34 91 207 1010 Ext 269, Fax: +31 91 207 1040, E-mail: karen.heath@salud.madrid.org.

Disclosure Statement: A.B was a recipient of a postdoctoral fellowship by Lilly, España but they did not finance any part of this work.

This work was supported by Grants and fellowships: This work was supported in part by the following grants: MINECO

(SAF2012–30 871), Comunidad de Madrid ENDOSCREEN (S2010/BMD-2396), FIS 09/01266 and 12/00649 to A.C.-B, and the VII Jose Igea Award by the Spanish Society of Pediatric Endocrinology Foundation (F-SEEP). A.H-O was a recipient of a FPI Ph.D. studentship from the Basque Country and S.B-S a postdoctoral CIBERER fellowship. A.B was a recipient of a postdoctoral fellowship by Lilly, España.

References

1. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of *SHOX* haploinsufficiency. *J Med Genet.* 2007;44:306–313.
2. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Veke-mans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. *SHOX* mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet.* 1998;19:67–69.
3. Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barros A, Cormier-Daire V, Heath KE. A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of *SHOX* is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet.* 2005;77:533–544.
4. Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suner D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, Rosell J, Aragones A, Caimari M, Argente J, Ross JL, Zinn AR, Gracia R, Lapunzina P, Campos-Barros A, Heath KE. Clinical and molecular evaluation of *SHOX*/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E404–412.
5. Benito-Sanz S, Royo JL, Barroso E, Paumard-Hernandez B, Barreda-Bonis AC, Liu P, Gracia R, Lupski JR, Campos-Barros A, Gomez-Skarmeta JL, Heath KE. Identification of the first recurrent PAR1 deletion in Leri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel *SHOX* enhancer. *J Med Genet.* 2012;49:442–450.
6. Sabherwal N, Bangs F, Roth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, van der Kamp H, Kapeller J, Tickle C, Rappold G. Long-range conserved non-coding *SHOX* sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet.* 2007;16:210–222.
7. Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ, Winter RM. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet.* 1998;19:70–73.
8. Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Roth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, Rappold G. Enhancer deletions of the *SHOX* gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet.* 2009;46:834–839.
9. Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Libório DC, Kim CA, Arnhold IJ, Mendonça BB. *SHOX* mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66(1):130–135.
10. Ross JL, Scott C, Jr., Marttila P, Kowal K, Nass A, Papenhausen P, Abboudi J, Osterman L, Kushner H, Carter P, Ezaki M, Elder F, Wei F, Chen H, Zinn AR. Phenotypes Associated with *SHOX* Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5674–5680.
11. Shears DJ, Guillen-Navarro E, Sempere-Miralles M, Domingo-Jimenez R, Scambler PJ, Winter RM. Pseudodominant inheritance of Langer mesomelic dysplasia caused by a *SHOX* homeobox missense mutation. *Am J Med Genet.* 2002;110:153–157.
12. Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CI, Jr., Marttila P, Ross JL. Complete *SHOX* deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet.* 2002;110:158–163.

13. Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE. Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am J Med Genet A*. 2007;143A:933–938.
14. Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F, Garavelli L, Varriale L, Mazza V, Stanghellini I, Percesepe A, Forabosco A. The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin Genet*. 2007;72:490–491.
15. Maroteaux P, Martinelli B, Campailla E. [Acromesomelic dwarfism]. *La Presse medicale*. 1971;79:1839–1842.
16. Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F, Warman ML. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet*. 2004;75:27–34.
17. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17300–17305.
18. Tsuji T, Kunieda T. A loss-of-function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (Npr2) gene is responsible for disproportionate dwarfism in cn/cn mouse. *J Biol Chem*. 2005;280:14288–14292.
19. Sogawa C, Tsuji T, Shinkai Y, Katayama K, Kunieda T. Short-limbed dwarfism: slw is a new allele of Npr2 causing chondrodysplasia. *J Hered*. 2007;98:575–580.
20. Hume AN, Buttgeriet J, Al-Awadhi AM, Al-Suwaidi SS, John A, Bader M, Seabra MC, Al-Gazali L, Ali BR. Defective cellular trafficking of missense NPR-B mutants is the major mechanism underlying acromesomelic dysplasia-type Maroteaux. *Hum Mol Genet*. 2009;18:267–277.
21. Borrelli P, Fasanelli S, Marini R. Acromesomelic dwarfism in a child with an interesting family history. *Pediatr Radiol*. 1983;13:165–168.
22. Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, Prickett TC, Espiner EA, Potter LR, Warman ML. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1229–1232.
23. Vasques GA, Amano N, Docko AJ, Funari MF, Quedas EP, Nishi MY, Arnhold JJ, Hasegawa T, Jorge AA. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) gene as a cause of short stature in patients initially classified as idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1636–1644.
24. Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, Hasegawa T. Identification and functional characterization of two novel NPR2 mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:E713–718.
25. Wang SR, Jacobsen CM, Carmichael H, Edmund AB, Robinson JW, Olney RC, Miller TC, Moon JE, Mericq V, Potter LR, Warman ML, Hirschhorn JN, Dauber A. Heterozygous Mutations in Natriuretic Peptide Receptor-B (NPR2) Gene as a Cause of Short Stature. *Hum Mutat*. 2015;36(4):474–81.
26. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*. 2006;27:47–72.
27. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*. 1991;252:120–123.
28. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinol*. 1992;130:229–239.
29. Benito-Sanz S, del Blanco DG, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, Argente J, Campos-Barros A, Heath KE. PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat*. 2006;27:1062.
30. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V, French SGM. High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet*. 2006;43:735–739.
31. Carrascosa A, Fernandez JM, Fernandez C, Ferrandez A, Lopez-Siguero JP, Sanchez E, Sobradillo B, Yeste D. Spanish growth studies 2008. New anthropometric standards. *Endocrinología y nutrición: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición*. 2008;55:484–506.
32. Benito-Sanz S, Gorbenco del Blanco D, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, Bunyan D, Maloney V, Argente J, Cormier-Daire V, Campos-Barros A, Heath KE. Characterization of SHOX deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet*. 2006;79(2):409–414.
33. Hachiya R, Ohashi Y, Kamei Y, Suganami T, Mochizuki H, Mitsui N, Saitoh M, Sakuragi M, Nishimura G, Ohashi H, Hasegawa T, Ogawa Y. Intact kinase homology domain of natriuretic peptide receptor-B is essential for skeletal development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4009–4014.
34. Barca-Tierno V, Aza-Carmona M, Barroso E, Heine-Suner D, Azmanov D, Rosell J, Ezquieta B, Montane LS, Vendrell T, Cruz J, Santos F, Rodriguez JI, Pozo J, Argente J, Kalaydjieva L, Gracia R, Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Heath KE. Identification of a Gypsy SHOX mutation (p.A170P) in Leri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia. *Eur J Hum Genet*. 2011;19:1218–1225.
35. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM. on behalf of the 2007 ISS Consensus Workshop participants 2008 Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4210–4217.
36. Marchini A, Hacker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, Karperien M, Rappold G. BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet*. 2007;16:3081–3087.
37. Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchon A, Benito-Sanz S, Rodriguez JI, Argente J, Campos-Barros A, Scambler PJ, Heath KE. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet*. 2011;20:1547–1559.
38. Decker E, Durand C, Bender S, Rodelsperger C, Glaser A, Hecht J, Schneider KU, Rappold G. FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet*. 2011;20:1524–1535.
39. Tiecke E, Bangs F, Blaschke R, Farrell ER, Rappold G, Tickle C. Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol*. 2006;298:585–96.
40. Peake NJ, Hobbs AJ, Pingguan-Murphy B, Salter DM, Berenbaum F, Chowdhury TT. Role of C-type natriuretic peptide signalling in maintaining cartilage and bone function. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22:1800–1807.
41. Binder G. Short Stature due to SHOX Deficiency: Genotype, Phenotype, and Therapy. *Horm Res Paediatr*. 2011;75:81–89.
42. Blum WF, Crowe BJ, Quigley CA, Jung H, Cao D, Ross JL, Braun L, Rappold G, Group SS. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:219–228.

NPPB and *ACAN*, Two Novel *SHOX2* Transcription Targets Implicated in Skeletal Development

Miriam Aza-Carmona^{1,2,3*}, Veronica Barca-Tierno^{1,2,3}, Alfonso Hisado-Oliva^{1,2}, Alberta Belinchón^{1,2}, Darya Gorbenko-del Blanco³, Jose Ignacio Rodriguez⁴, Sara Benito-Sanz^{1,2}, Angel Campos-Barros^{1,2}, Karen E. Heath^{1,2*}

1 Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto Carlos III, Madrid, Spain, **3** Dept. Celular Biology, Immunology & Neurosciences, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Abstract

SHOX and *SHOX2* transcription factors are highly homologous, with even identical homeodomains. Genetic alterations in *SHOX* result in two skeletal dysplasias; Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and Langer mesomelic dysplasia (LMD), while no human genetic disease has been linked to date with *SHOX2*. *SHOX2* is, though, involved in skeletal development, as shown by different knockout mice models. Due to the high homology between *SHOX* and *SHOX2*, and their functional redundancy during heart development, we postulated that *SHOX2* might have the same transcriptional targets and cofactors as *SHOX* in limb development. We selected two *SHOX* transcription targets regulated by different mechanisms: 1) the natriuretic peptide precursor B gene (*NPPB*) involved in the endochondral ossification signalling and directly activated by *SHOX*; and 2) Aggrecan (*ACAN*), a major component of cartilage extracellular matrix, regulated by the cooperation of *SHOX* with the SOX trio (*SOX5*, *SOX6* and *SOX9*) via the protein interaction between *SOX5/SOX6* and *SHOX*. Using the luciferase assay we have demonstrated that *SHOX2*, like *SHOX*, regulates *NPPB* directly whilst activates *ACAN* via its cooperation with the SOX trio. Subsequently, we have identified and characterized the protein domains implicated in the *SHOX2* dimerization and also its protein interaction with *SOX5/SOX6* and *SHOX* using the yeast-two hybrid and co-immunoprecipitation assays. Immunohistochemistry of human fetal growth plates from different time points demonstrated that *SHOX2* is coexpressed with *SHOX* and the members of the SOX trio. Despite these findings, no mutation was identified in *SHOX2* in a cohort of 83 LWD patients with no known molecular defect, suggesting that *SHOX2* alterations do not cause LWD. In conclusion, our work has identified the first cofactors and two new transcription targets of *SHOX2* in limb development, and we hypothesize a time- and tissue-specific functional redundancy between *SHOX* and *SHOX2*.

Citation: Aza-Carmona M, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchón A, Gorbenko-del Blanco D, et al. (2014) *NPPB* and *ACAN*, Two Novel *SHOX2* Transcription Targets Implicated in Skeletal Development. PLoS ONE 9(1): e83104. doi:10.1371/journal.pone.0083104

Editor: Andre van Wijnen, University of Massachusetts Medical, United States of America

Received: July 2, 2013; **Accepted:** October 30, 2013; **Published:** January 8, 2014

Copyright: © 2014 Aza-Carmona et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the: Ministerio de Innovación y Ciencia [MINECO SAF2012-30871 y MICINN SAF2009-08230]. Postdoctoral fellowships were awarded from MICINN ("Juan de la Cierva", M.A.-C) and CIBERER [S.B.-S]. Predoctoral fellowships were awarded from the Ministerio de Educación (FPI, V.B.-T), Basque Country (A.H.-S) and MICINN SAF2009-08230 (A.B.-M). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: karen.heath@salud.madrid.org

† These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Dept. of Genetics & Microbiology, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Introduction

Alterations of *SHOX* and its enhancers have been reported in two skeletal dysplasias: Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127300) and Langer mesomelic dysplasia (LMD, MIM 249700) as well as in a small proportion of individuals with idiopathic short stature (MIM 300582) [1–9]. Heterozygous mutations in *SHOX* or its enhancers results in LWD, a disproportionate short stature syndrome due to mesomelic shortening of the limbs, and the typical abnormality of the forearms known as Madelung deformity, characterized by the bowing of the radius and dorsal dislocation of the distal ulna. LMD is due to homozygous or compound heterozygous mutations in *SHOX* or its enhancers, resulting in severely disproportionate short stature with marked mesomelic and rhizomelic limb shortening. The estimated

prevalence of *SHOX* haploinsufficiency is 1 in 1000 individuals [10].

The clinical symptoms produced by *SHOX* alterations, reflect its molecular function and also its expression pattern during limb development. *SHOX* belongs to the paired-related homeodomain family of transcription factors [11]. Two major *SHOX* isoforms exist, *SHOXa* and *SHOXb* [1], both containing a homeodomain (HD), but only *SHOXa* (which from now will be called in this paper *SHOX*) acts as a transcriptional activator in osteogenic cells via its transactivation domain, the OAR (Otp, Aristaless, Rax), which is absent in *SHOXb*. *SHOX* has been shown to regulate various genes involved in limb development: directly regulating the transcription of the natriuretic peptide precursor B gene (*NPPB*, MIM 600295) [12] which encodes the brain natriuretic protein (BNP), and fibroblast growth factor receptor 3 gene

(*FGFR3*, MIM 134934) [13], two genes involved in the signalling of endochondral ossification. In contrast, *SHOX* cooperates with the *SOX* trio, via its protein interaction with *SOX5*/*SOX6*, to regulate the Aggrecan gene (*ACAN*, MIM 155760) which encodes a major component of cartilage extracellular matrix [14]. Recently, the homeobox transcription factor *HOXA9*, which is thought to be important in limb patterning [15], has been identified as the first regulator of *SHOX* expression [16].

During limb development, *SHOX* is principally expressed in the mesomelic portions of the limbs [17,18], in the mesenchymal cells during the first steps of chondrogenesis [17,18] and in the developing chondrocytes of the human growth plate throughout endochondral ossification [14,19].

SHOX2 is the human paralog of *SHOX*, presenting a global homology of 83% and identical homeodomains [11]. Two *SHOX2* isoforms exist, *SHOX2a* (which we call *SHOX2* from now onwards) and *SHOX2b*, which differ only in their N-terminal regions [11]. However, the functional significance of these isoforms remains elusive.

Whilst no ortholog for *SHOX* exists in mice, an ortholog of *SHOX2* does exist [17]. The first *Shox2* knockout mouse was embryonically lethal, but it revealed the importance of this gene in palatogenesis and heart and limb development [20]. Subsequent analyses of different *Shox2* knockout mice and in xenopus showed that *Shox2* participates in an intricate signalling pathway that regulates the sinoatrial node formation and pacemaking function [21–24].

Different conditional *Shox2* knockout mice models have showed severe rhizomelic limb but also mesomelic hindlimb shortening [20,25,26]. *Shox2* regulates progression through chondrogenesis at two distinct stages, it prevents the onset of early chondrocyte differentiation and it controls the transition from mature to hypertrophic chondrocytes, regulating the expression of, among others, *Sox9*, *Sox6*, *Acan*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Runx2* and *Runx3* [26,27]. When *Shox2* is deleted from developing chondrocytes, *Bmp4* expression is significantly increased, driving chondrocyte maturation and hypertrophy. However, when *Shox2* is deleted earlier in the limb bud, as in micromass cultures of *Shox2* mutant limb cells or in primary mouse bone marrow mesenchymal stem cells, only a modest increase in *Bmp4* expression occurs, sufficient to trigger early chondrogenesis but not enough to drive chondrocyte maturation and hypertrophy [26,27].

We set out to determine whether *SHOX2* could regulate the same transcription targets and interact both with *SHOX* and its cofactors, *SOX5* and *SOX6*, during limb development as: 1) *SHOX* and *SHOX2* are highly homologous; 2) both are expressed in the developing limbs, even overlapping in some regions [17,18]; 3) they possess similar transcriptional activities [22]; and 4) functional redundancy between these proteins has been demonstrated in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function [28].

Using luciferase reporter assays, we show that *SHOX2*, like *SHOX*, has the capacity to activate directly *NPPB* whilst requiring the *SOX* trio to activate *ACAN*. Moreover, using yeast two-hybrid assays and co-immunoprecipitation we have characterized the domains implicated in the dimerization of *SHOX2* and its interaction with *SHOX*, *SOX5* and *SOX6*. Immunohistochemistry of human fetal growth plates demonstrated that *SHOX2* is coexpressed with *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* and *SHOX*. Taken together, our work has identified the first cofactors and two new transcription targets of *SHOX2* in limb development.

Materials and Methods

Generation of recombinant constructs

The full-length cDNA of *SHOX2a* (NM_006884.3) was obtained by eliminating a 70 bp region of the IMAGE *SHOX2* clone 4122010 (Source Bioscience, Berlin, Germany). The two regions of interest of this clone were amplified (PCRs A and B) and then fused by PCR ligation using appropriate oligonucleotides (Table S1 in File S1). The obtained product was subsequently cloned using the TA-cloning kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and then subcloned into different plasmids. The *SHOX2b* (NM_003030.4) and various *SHOX2a* fragments were amplified using the *SHOX2a* cloned region and appropriate oligonucleotides (Table S1 in File S1). The *SHOX2a* missense mutations and various *SHOX2a* fragments were created using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (GE Healthcare, Fairfield, Co, USA), appropriate mutagenic oligonucleotides and different plasmids as templates (Table S2 in File S1). The *SHOX*, *SOX5*, *SOX6* and *SOX9* clones were as previously described [14].

The *NPPB* 1030 bp promoter was amplified using oligos and PCR conditions as previously described [12], cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) and then subcloned into pGL3-Basic luciferase vector (Promega, Madison, WI, USA). The *Acan* enhancer plasmid (4XA1)pCol2Luc [29] was kindly donated by Dr Veronique Lefebvre.

Cell culture

Human osteosarcoma (U2OS, ATCC HTB-96) and human embryonic kidney 293 cells (HEK293, ATCC CRL-1573) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Gibco BRL), supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen Gibco BRL) and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen Gibco BRL). Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂.

Luciferase assay

Luciferase assays were performed with U2OS cells as previously described [14]. Transient transfections in U2OS or stable U2OS cell lines expressing *SHOX* under an inducible system have proven to be very valuable tools allowing the initial characterization of the function of *SHOX* and *SHOX2* and the identification of their target genes and cofactors [11–14,16,27,30]. Basically, cells were transfected using FuGene (Roche Applied Bioscience, Switzerland) at a DNA:Fugene ratio of 2:1 with different combinations of *SHOX*, *SHOX2*, *SOX5*/*SOX6* and *SOX9* expression plasmids and reporter vectors. In the case of *NPPB* reporter assays, 200 ng pRL-TK, 1500 ng reporter plasmid and 250 ng expression plasmids was employed whilst, in the *Acan* reporter assays, 1.5 ng pRL-SV40, 750 ng reporter vector and 125 ng expression plasmids were added. Samples were normalized, firstly, with respect to the Renilla luciferase activity and then to that transfected with the empty reporter plasmid. Each combination was transfected three times, and three biological replicates were analyzed. Statistical analyses were undertaken with SPSS v15.0 for Windows. We employed one-factor analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post hoc test for analysing the results of luciferase assay.

Yeast two-hybrid assay

The yeast two-hybrid assay was undertaken as previously described [14]. All values represent the mean and standard deviation of five independent transformation experiments, each performed in triplicate.

Co-immunoprecipitation and Western blot analysis

Immunoprecipitations were carried out in HEK293 cells as previously described [14]. Western blot analyses were undertaken using the following rabbit polyclonal antibodies: anti-SHOX [30] at a dilution of 1:3000, anti-SHOX2 (SAB2102137, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at a dilution of 1:1000, anti-SOX5 (Ab26041, Abcam, Cambridge, UK) and SOX6 (Sc-20092, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) at a dilution 1:2000. No cross reactivity was observed between SHOX2 and SHOX (Fig. S1 in File S1).

Immunohistochemistry

Human tibia growth plate sections were obtained from spontaneously aborted normal fetuses of 18, 27, 32 and 38 weeks, after obtaining ethical approval and informed consent. The detailed immunohistochemical procedure was as previously described [14]. Negative controls (Fig. S1 in File S1) were performed by: 1) replacing the primary antibody with PBS; 2) using a rabbit polyclonal IgG isotype control (Ab27472, Abcam) at a dilution of 1:50; 3) incubating sections of normal adult colon (where SHOX2 protein is not expected to be expressed) with the SHOX2 antibody. Specificity of the employed SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 antibodies had been previously demonstrated [14].

SHOX2 mutation screening

Ethical approval was obtained from “Hospital Universitario La Paz”. All participants provided informed consent for the performed studies. The cohort consisted of 83 probands with LWD or suspected LWD. Clinical details were obtained for all patients recruited into the study. Whenever possible, these included birth details, anthropometric measurement, actual height and height standard deviation scores according to national standards [31], physical examination of extremities, and X-rays of the lower arm. Family histories were also documented, including parental heights. In all cases, the presence alterations in *SHOX* or its enhancers had been previously excluded [4,7–9,32,33]. The control cohort consisted of 95 Spanish individuals with normal heights (Spanish DNA Bank, University of Salamanca).

Peripheral blood was drawn from probands for DNA extraction. Genomic DNA was isolated by the salt precipitation method [34]. The screening of point mutations, small deletions and insertions in the coding sequences and intron/exon boundaries of *SHOX2* (NM_006884.3) was performed using High Resolution Melting. DNA fragments were amplified using MegaMix-Gold (Microzone, Southampton, UK) and LC Green Plus + fluorescent dye (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA). PCR conditions are available in Table S3 in File S1. Melting curves of amplified samples were analyzed using LightScanner HR96 (BioFire Diagnostics). Subsequent sequencing of any sample with abnormal melting profiles was carried out using the BigDye Terminator V3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

SHOX2 deletions and duplications were studied using microsatellite markers or a self-designed MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) assay. Microsatellite analysis was undertaken through the detection of heterozygosity at four different markers flanking *SHOX2* (Table S4 in File S1). PCR conditions were as previously described (4). The self-designed MLPA assay consisted of five *SHOX2* probes and three control fragments (Table S5 in File S1). MLPA reactions were carried out using EK1 SALSA MLPA Kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer’s protocol. The ratios of the test’s peak areas versus control’s samples were determined

subsequently. Normal peaks were classified as showing a ratio of 0.65–1.35 whilst deletions and duplications were classified as having a ratio <0.65 or >1.35, respectively.

Results

SHOX2 activates *NPPB* and *ACAN*

We firstly analyzed the ability of SHOX2 to activate *NPPB*, a direct SHOX target (12), using a luciferase assay in U2OS cells. Cells overexpressing SHOX2 were cotransfected with a luciferase reporter plasmid carrying the *NPPB* promoter. SHOX2 was able to activate *NPPB* expression to an even greater degree than that observed for SHOX (Fig. 1A). With the purpose of confirming the SHOX2 activation, we included two SHOX2 mutants which mimic SHOX mutations reported in LWD patients (SHOX mutation database; http://hyg-serv-01.hyg.uni-heidelberg.de/lovd/index.php?select_db=SHOX): p.L155V that mimics the SHOX homeodomain p.L132V mutation, and p.Q234X, homolog to the SHOX p.Q211X mutation in which the OAR domain is absent. Both SHOX2 mutants failed to activate the *NPPB* promoter (Fig. 1A).

We subsequently set out to determine if SHOX2 was also able to activate the *Acen* enhancer via the SOX trio. Luciferase assays were undertaken using combinations of SHOX2, SOX5, SOX6 and SOX9. Due to the mutual redundancy of SOX5 and SOX6 [35] these proteins were included independently in the assays. As with SHOX, SHOX2 was able to activate *Acen* enhancer transactivation in cooperation with SOX6/SOX9 (Fig. 1B) and SOX5/SOX9 (Fig. S2 in File S1), but not directly (Fig. 1B and Fig. S2 in File S1). The two SHOX2 mutants, p.L155V and p.Q234X, reduced *Acen* enhancer activation (Fig. 1B and Fig. S2 in File S1), as observed with their SHOX homologues [14].

SHOX2 isoforms dimerize

Given that cooperative dimerization of paired-related homeodomains to DNA increases the transactivation efficiency to higher levels [36] and that SHOX preferentially binds to DNA as dimers [30], we assumed that SHOX2 should also dimerize to transactivate its target genes. Using the yeast two-hybrid assay, we verified that the SHOX2a and SHOX2b isoforms are capable of homo- and hetero-dimerization (Fig. 2A).

Using a series of SHOX2 deletion constructs (Fig. 2B) and the yeast two-hybrid assay, we observed that only the SHOX2(139–331) construct containing the homeodomain and the OAR domain clearly interacted with SHOX2 (Fig. 2B), whilst weaker interactions were observed for the constructs that contained only one of these two domains.

Subsequently, we analyzed the interaction capacity of wild-type SHOX2 with seven artificially designed SHOX2 missense mutations (Fig. 2C) that mimic SHOX mutations identified in LWD patients (SHOX mutation database, http://hyg-serv-01.hyg.uni-heidelberg.de/lovd/index.php?select_db=SHOX). Two homeodomain mutants (p.L155V and p.A193P) together with the OAR mutant p.R319P diminished their interaction capacity with SHOX2 (Fig. 2C). Interestingly, the SHOX2 p.R196C homeodomain mutant heterodimerizes with SHOX2 at similar levels to that of the wild-type (Fig. 2C), mimicking to that what was observed for its SHOX homologue, p.R173C [14,37].

Thus, these experiments showed that both the homeodomain and the OAR are the domains implicated in the SHOX2 dimerization.

SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6

Previously we had demonstrated that SHOX interacts with SOX5/SOX6 to activate the *Acen* enhancer in combination with SOX9 [14], thus, we proposed that as SHOX2 also increases *Acen*

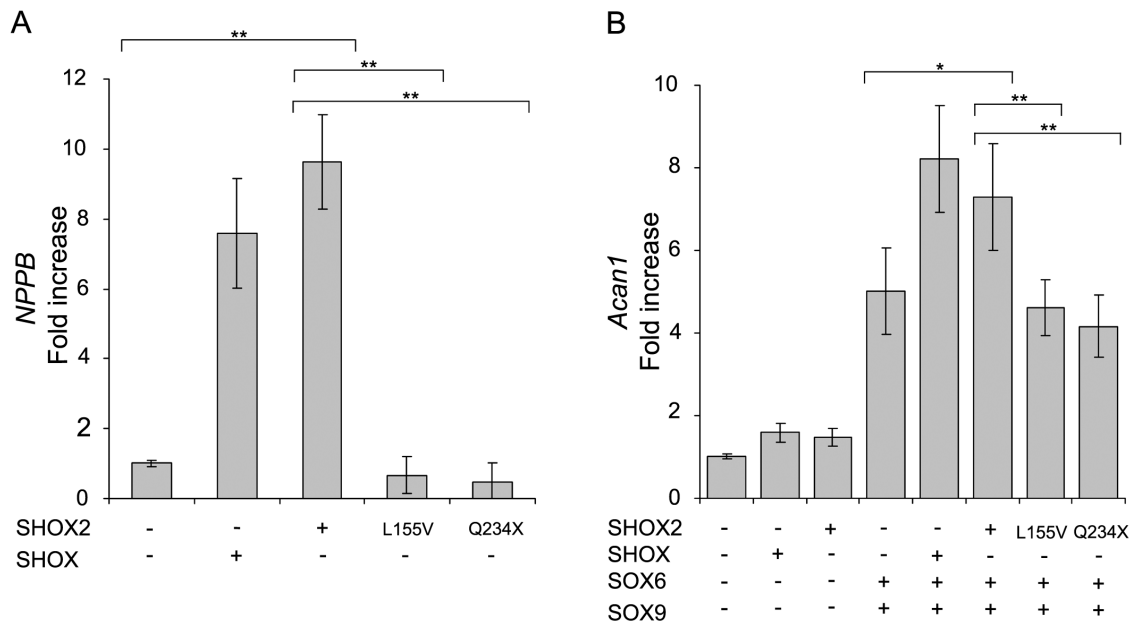


Figure 1. SHOX2 transactivates *NPPB* and *ACAN*. Luciferase reporter activity of U2OS cells transfected with reporter plasmids containing the *NPPB* promoter (A) or the *Acn1* enhancer (B), renilla luciferase control plasmid and different combinations of SHOX, SHOX2, SHOX2(p.L155V), SHOX2(p.Q234X), SOX6 and SOX9 expression plasmid as indicated. Fold-increase values were obtained by normalizing the relative luciferase units of each sample with the relative luciferase units of the sample transfected only with the reporter plasmid. All values represent the mean and standard deviation of three independent samples, with each sample assayed in triplicate. Significant p-values obtained comparing different independent samples are indicated with an asterisk (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0083104.g001

expression, it could interact with the SOX trio in a similar manner. The yeast two-hybrid assay showed that SHOX2 interacts strongly with SOX6 whilst very weakly with SOX5 (Fig. 3A). Co-immunoprecipitation in HEK293 cells clearly demonstrated that SHOX2 interacts with both SOX5 and SOX6 (Fig. 3B).

Given that SOX5 and SOX6 are highly homologous, with an overall homology of 67% and 90% identity in their HMG and coiled-coil domains [38], we decided to characterize only the SHOX2-SOX6 interaction using the yeast two-hybrid assay and a series of SHOX2 deletion constructs (Fig. 3C), SHOX2 missense mutations (Fig. 3D) and SOX6 deletion constructs (Fig. 3E). The three SHOX2 deletion constructs that were able to interact with SOX6, SHOX2(1–200), SHOX2(139–200) and SHOX2(139–331), share the homeodomain (Fig. 3C). The assay with various SHOX2 missense mutations confirmed that the homeodomain is involved in the SHOX2-SOX6 interaction since all the homeodomain mutants (p.L155V, p.A193P and p.R196C) diminished their interaction ability (Fig. 3D). Moreover, the p.K139E mutant, located in the amino acid adjacent to the homeodomain, also reduced its interaction capacity with SOX6 (Fig. 3D), suggesting that this amino acid is important for the interaction, as observed for its SHOX homologue p.K116E, which had a reduced interaction with SOX6 [14]. Although the SOX6(479–787) construct containing the HMG domain alone is able to interact with SHOX2 (Fig. 3E), the fact that the SOX6(263–787) construct containing both the HMG and the second coiled-coil domain interacts with SHOX2 at a greater strength than the SOX6 full protein, suggests that the second coiled-coil may confer structural stability to the HMG domain.

Therefore, the SHOX2 homeodomain and the SOX6 HMG domain are involved in the SHOX2-SOX6 interaction.

SHOX2 interacts with SHOX

Due to the high homology and the overlapping expression pattern in limb development of SHOX and SHOX2, we set out to determine if they could interact between each other. Using the yeast two hybrid assay we identified that the two SHOX2 isoforms could interact with SHOX *in vivo* (Fig. 4A). We confirmed the SHOX2a-SHOX interaction by co-immunoprecipitation of HEK293 nuclear lysates overexpressing SHOX2a and SHOX (Fig. 4B).

Subsequently, we determined the domains implicated in this interaction employing deletion constructs (Fig. 4C–D) and SHOX missense mutations (Fig. 4E) in the yeast two hybrid assay. Only the SHOX2(139–331) construct containing the homeodomain and the C-terminal region including the OAR domain clearly interacted with SHOX (Fig. 4C), suggesting that both SHOX2 regions are required for the interaction with SHOX.

Among the different SHOX fragments examined, the SHOX(1–211), SHOX(117–274), SHOX(117–292) and SHOX(178–292) constructs were able to interact with SHOX2 (Fig. 4D) but to levels below 50% of the wildtype. The SHOX fragments appeared to be less stable and the SHOX interacting domain with SHOX2 was not clearly visible. Thus, further analysis was undertaken using eight SHOX missense mutations observed in LWD patients and located throughout the protein (Fig. 4E). The SHOX homeodomain mutants p.L132V and p.A170P showed a significant reduction in their interaction capacity with SHOX2 (Fig. 4E), whilst the OAR mutant p.D278A, had a reduced interaction but to a lesser extent (Fig. 4E). Therefore, the SHOX homeodomain appears to be the domain principally involved in the interaction with SHOX2 whilst the OAR domain appears to stabilize the interaction.

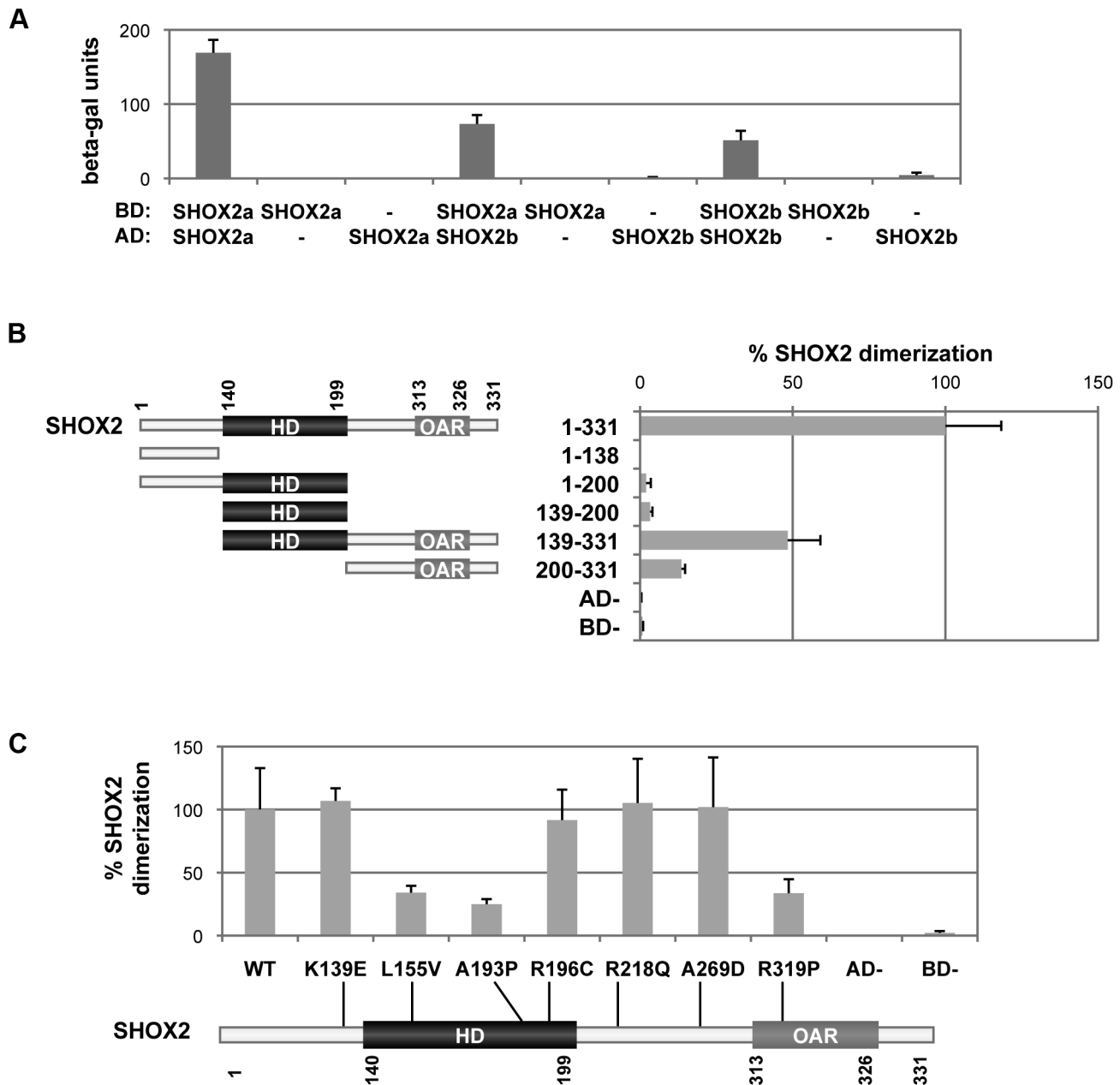


Figure 2. Identification and characterization of the SHOX2 dimerization. A) SHOX2a and SHOX2b homo- and hetero-dimerize in the yeast-two hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with pGBT9 (containing the GAL4 binding domain – BD) and pACT2 (containing the GAL4 activation domain – AD) vectors. Interactions were determined using a β -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Empty vectors were employed as negative controls. B) Characterization of the SHOX2 domains involved in the SHOX2 dimerization. The SHOX2 protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is shown with the various analysed SHOX2 fragments, indicating their name and amino acids that they contain. To the right of each fragment the corresponding yeast two-hybrid results are shown. Y187 cells were cotransformed with SHOX2 in the pGBT9 vector and SHOX2 fragments in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SHOX2 fragments to that obtained with full-length SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls. C) SHOX2 mutants impair the SHOX2 dimerization. SHOX2 protein structure scheme showing the localization of the seven analysed missense mutations. Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with SHOX2 in the pGBT9 vector and the different SHOX2 mutants in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the various SHOX2 mutants to the wildtype SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls.

doi:10.1371/journal.pone.0083104.g002

SHOX2 is coexpressed with SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 in the human growth plate

Tissue and time dependent coexpression of proteins must occur for the interactions to occur between these proteins. Previous studies have shown that *SHOX2* expression overlaps with *SHOX*

and *SOX9* in certain regions and stages of limb development [17,18].

We firstly studied if SHOX2 is expressed in human fetal tibia growth plates of different developmental stages by immunohistochemistry, and showed that SHOX2 is expressed in the reserve,

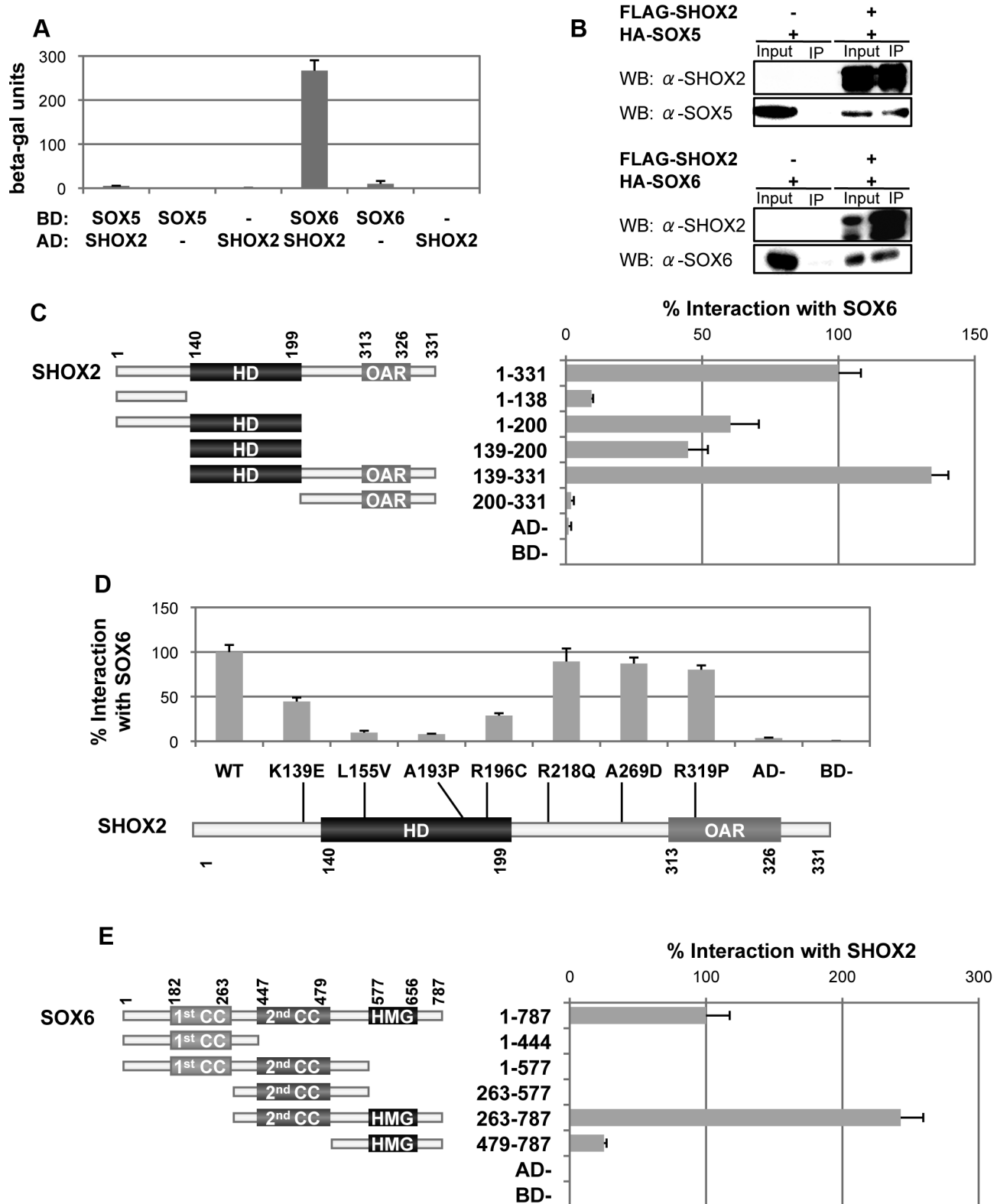


Figure 3. Identification and characterization of the SHOX2-SOX5 and SHOX2-SOX6 protein interactions. A) SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6 in the yeast-two hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with the pGBT9 (BD) and pACT2 (AD) vectors. Interactions were determined by using a β -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Empty vectors were employed as negative controls. B) SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6 in human cells. Nuclear extracts of HEK293 cells overexpressing FLAG:SHOX2 and HA:SOX5 or HA:SOX6 were immunoprecipitated using anti-FLAG-agarose. Western blots (WB) of immunoprecipitates (IP) were probed with SHOX2, SOX5 and SOX6 antibodies. Nuclear extracts corresponding to 10% input were included as protein expression controls and nuclear extract immunoprecipitates of cells transfected only with HA:SOX5 or HA:SOX6 were included as negative controls. The western-blot images clearly show that SOX5 and SOX6

immunoprecipitate only in the presence of SHOX2. C) Characterization of the SHOX2 domains involved in the interaction with SOX6. An scheme of the SHOX2 protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is shown with the various analysed SHOX2 fragments, indicating their name and the amino acids that they contain. To the right of each fragment, the corresponding yeast two-hybrid results are shown. Y187 cells were cotransformed with SOX6 in the pGBT9 vector and the SHOX2 fragments in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SHOX2 fragments to that obtained with full-length SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls. D) SHOX2 mutants impair the interaction with SOX6. SHOX2 protein structure scheme showing the localization of the seven missense mutations analyzed. Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with SOX6 in the pGBT9 vector and the different SHOX2 mutants in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the various SHOX2 mutants to the wildtype SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls. E) Characterization of SOX6 domains involved in the interaction with SHOX2 using the yeast two-hybrid assay. SOX6 is schematically drawn showing the amino acid location of two dimerization domains, the first and the second coiled-coils (1st cc and 2nd cc, respectively), and the HMG DNA-binding domain. Depicted below are the SOX6 generated constructs, indicating the name of each fragment and the amino acids that they contain. Y187 cotransformed cells with the different SOX6 fragments in the pGBT9 vector and SHOX2 in the pACT2 vector. The protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SOX6 fragments to that obtained with full-length SOX6. Empty vectors were employed as negative controls. doi:10.1371/journal.pone.0083104.g003

proliferative and hypertrophic zones at 18, 27, 32 and 38-weeks (Fig. S3 in File S1). Subsequently, we also demonstrated that SHOX2 is coexpressed with SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 proteins in the three differentiation regions of 18 and 38-weeks human fetal tibia growth plates (Fig. 5 and Fig. S4 in File S1).

SHOX2 mutations are not responsible for the LWD phenotype in our cohort of patients with unknown molecular defect

Defects in SHOX or its regulatory elements have been identified in ~70% of LWD patients [33,39,40], whilst the remaining ~30% remain genetically uncharacterized. Screening of the coding regions and intron-exon boundaries of *SHOX2* in 83 LWD patients with no known defect was performed using HRM. Samples with abnormal melting profiles were subsequently sequenced. Complete or intragenic *SHOX2* deletions/duplications were analysed using four microsatellite markers surrounding *SHOX2* (Table S4 in File S1) or by a self-designed MLPA assay (Table S5 in File S1).

Only two variants were identified, both located in exon 1 of *SHOX2*: a duplication of three glycines in the glycine-rich repeat, p.Gly77-Gly78dup (c.232_233dupGAGGAGGTG) and a missense mutation p.E21K (c.61G>A). We therefore evaluated the pathogenicity of these variants by determining their frequencies in control populations and by analyzing their cosegregation with the LWD phenotype when possible. In contrast to SHOX, where insertions and deletions of the homologous SHOX glycine repeat have been described in patients with LWD/ISS (SHOX mutation database, http://hyg-serv-01.hyg.uni-heidelberg.de/lovd/index.php?select_db=SHOX), the *SHOX2* glycine repeat length appears to be a non-pathogenic CNV, since 183/7815 controls (Exome Variant Server) and 3/95 Spanish control individuals with normal heights carried this three amino acid insertion. The second mutation, p.E21K was assessed in the control population and in family members. Although the p.E21K mutation was only present in 2/12092 individuals (Exome Variant Server) and was absent in the 95 Spanish normal height controls, it did not cosegregate with the phenotype in the family (data not shown). Thus, *SHOX2* is not the molecular cause of the studied LWD cases.

Discussion

We have demonstrated that SHOX2 regulates *NPPB* directly whilst activating *ACAN* via its cooperation with the SOX trio. The SHOX2 activation of the *NPPB* promoter was even higher than that observed for SHOX. Both analysed SHOX2 mutants, p.L155V with reduced dimerization capacity and the p.Q234X lacking the OAR domain, failed to upregulate *NPPB*, thus

suggesting that the SHOX2 homeodomain and the transactivation domain are both critical for the *NPPB* activation.

A role for *NPPB* during endochondral ossification and longitudinal growth was initially suggested by the observation of skeletal overgrowth and alterations in the growth plate of *Nppb* transgenic mice [41]. Despite this, no further implication in skeletal development has been reported to date. With our new data, it would be interesting to test if *Nppb* expression is reduced in embryonic limb bud micromass cultures from *Shox2* mutant mice models. In contrast, the involvement of BNP in cardiovascular function is much clearer, to the extent that this peptide is a biomarker for diagnosis and prognosis of heart failure [42]. Given that *Shox2* participates in heart development as shown by different knockout mice models [20,22,23], it is tempting to speculate that *Shox2* also regulates *Nppb* expression in heart and that the disruption of this pathway is critical for the heart failure in *Shox2* knockout mice models.

The other SHOX2 transcriptional target discovered in this work is *ACAN*, which codifies for Aggrecan, a main component of the cartilage extracellular matrix. Previously, our group demonstrated that SHOX interacts with SOX5/SOX6 to cooperate with SOX9 in the activation of *ACAN* [19]. As with SHOX, SHOX2 cannot directly activate the *Acan* enhancer but requires the cooperation of the SOX trio. These results correlate with those observed in *Shox2* mutant mice where *Acan* levels were significantly lower in *Col2a1-CreShox2* mutant limb bud micromass cultures [26]. Further characterization demonstrated that the SHOX2 homeodomain and OAR domains are both critical for this *Acan* induction, since mutants in both domains failed to upregulate *Acan*. In this work, we have also demonstrated that SHOX2 interacts with SOX5 and SOX6. The SHOX2 homeodomain was shown to interact with the SOX6 HMG domain, thus in agreement with the results observed with SHOX-SOX6 [14] and other protein interactions [43–45]. Interestingly, the p.K139E mutant, located in the amino acid adjacent to the homeodomain of SHOX2, reduced its interaction capacity with SOX6 as observed previously with the homologous SHOX mutant, p.K116E [14], thus, implicating that this amino acid is also important for the interaction.

Our finding the homeodomain of SHOX and SHOX2 is implicated in the heterodimerization agrees with previous studies of other homeodomain proteins [46]. This interaction could: 1) alter the transactivation of their transcription targets by interacting with different cofactors and/or binding to DNA with different affinities; and 2) regulate different transcription targets, compared to that of the homodimers. More research is required in order to decipher the biological function of the discovered SHOX-SHOX2 protein interaction. In the future, it will be important to confirm these interactions and enlighten our knowledge further using *in vivo*

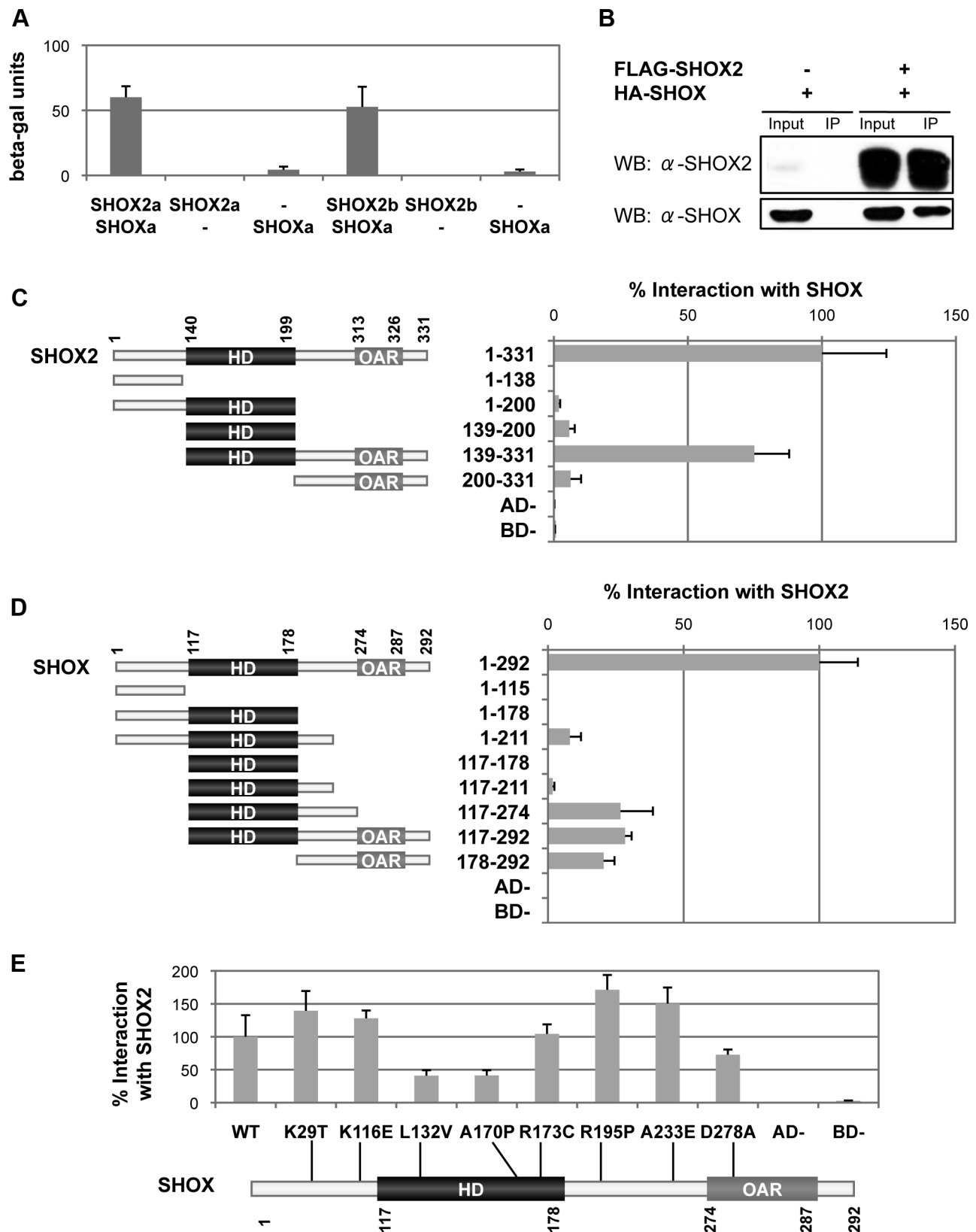


Figure 4. Identification and characterization of the SHOX2-SHOX interaction. A) SHOX2 interacts with SHOX in the yeast-two hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with the pGBT9 (BD) and pACT2 (AD) vectors. Interactions were determined by using a β -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Empty vectors were employed as negative controls. B) SHOX2 interacts with SHOX in human cells. Nuclear extracts of HEK293 cells overexpressing FLAG:SHOX2 and HA:SHOX were immunoprecipitated using anti-FLAG-agarose. Western blots (WB) of immunoprecipitates (IP) were probed with SHOX2 and SHOX antibodies. Nuclear extracts corresponding to 10% input were included as protein

expression controls and nuclear extract immunoprecipitates of cells transfected only with HA:SHOX were included as negative controls. The western-blot images clearly show that SHOX immunoprecipitate only in the presence of SHOX2. C) Characterization of the SHOX2 domains involved in the interaction with SHOX. A scheme of the SHOX2 protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is drawn together with the various SHOX2 fragments analysed, indicating the name of each fragment the amino acids that they contain. Yeast two-hybrid assay of Y187 cells cotransformed with SHOX in the pGBT9 vector and different SHOX2 fragments in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SHOX2 fragments to that obtained with full-length SHOX2. Empty vectors were employed as negative controls. D) Characterization of the SHOX domains involved in the interaction with SHOX2 using the yeast two-hybrid assay. An scheme of the SHOX protein structure showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain is shown with the various SHOX fragments analysed, indicating their name and the amino acids that they contain. To the right of each fragment are the corresponding yeast two-hybrid results. Y187 cells were cotransformed with the different SHOX fragments in the pGBT9 vector and with SHOX2 in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SHOX fragments to that obtained with full-length SHOX. Empty vectors were employed as negative controls. E) SHOX mutants impair the SHOX2-SHOX interaction. Schematic structure of SHOX showing the homeodomain (HD), the OAR domain and the localization of the eight analyzed missense mutations. Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with the different SHOX mutants in the pGBT9 vector and SHOX2 in the pACT2 vector. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the various SHOX mutants to the wildtype SHOX. Empty vectors were employed as negative controls.

doi:10.1371/journal.pone.0083104.g004

models, such as the *SHOX/Shox2* knock-in mouse model [28], a skeletal-specific conditional knock-in mouse or chicken limb buds.

For these interactions to have physiological importance, SHOX and SHOX2 have to be coexpressed in a tissue and time dependent manner. It has been reported that SHOX is mainly expressed in the mesomelic portion of the limbs whilst SHOX2 expression occurs in the rhizomelic region, but overlapping expression has been observed [17,18]. Further evidence of SHOX expression in the rhizomelic region has been shown in LMD individuals who lack SHOX, but present with both mesomelic and rhizomelic shortening of the limbs [47]. *Shox2* expression has also been detected in the mesomelic parts of the limbs in mouse [25,48], although it is difficult to extrapolate this data to humans due to the lack of a SHOX ortholog in mouse. In this work, we have demonstrated that SHOX and SHOX2, and also the SOX trio members are coexpressed in human tibial growth plates at different developmental stages. This data thus, argues for the coexpression of SHOX and SHOX2 proteins in some limb regions during specific time points.

Therefore, due to the high homology between SHOX and SHOX2 and their identical homeodomains, their overlapping expression in some limb regions, the sharing of transcriptional

targets implicated in limb development (i.e. *NPPB* and *ACAN*) and the total rescue of the heart defects and its tissue-specific rescue in limbs when *SHOX* was expressed in the *Shox2*KI/KI mice [28], we argue for the existence of functional redundancy between SHOX and SHOX2 in a tissue-specific manner during human embryonic development. An interesting argument for this redundancy is shown by the LWD phenotype. In these patients, the skeletal deformities, i.e. the characteristic Madelung deformity, is more pronounced in the distal region of the upper limb, where it has been suggested that there is no SHOX-SHOX2 coexpression [17], and thus SHOX2 cannot rescue the SHOX haploinsufficiency. However, in the more proximal region of the radius and ulna, SHOX and SHOX2 appear to be coexpressed [17], thus, SHOX2 may be able to rescue the phenotype. But, in the case of LMD, SHOX2 is unable to rescue the phenotype caused by the complete absence of SHOX, thus, this rescue mechanism may have a limiting threshold. Further studies will be required to support this hypothesis.

As we have shown that SHOX2 shares cofactors and transcription factors implicated in skeletal growth, we screened for *SHOX2* alterations in a cohort of 83 patients with LWD or possible LWD with no known PAR1 defect. No pathogenic

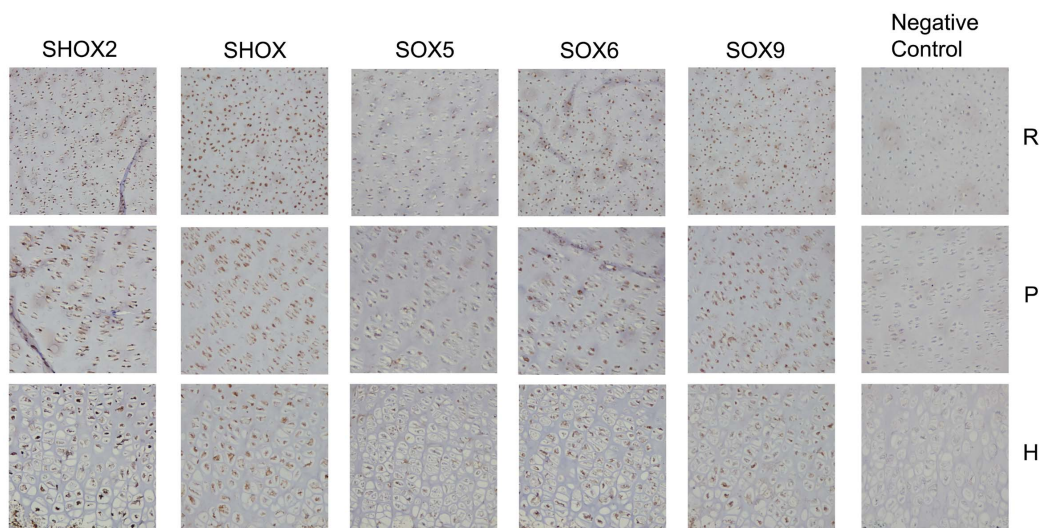


Figure 5. SHOX2 is coexpressed with SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 in the 18-week human fetal growth plate. Immunohistochemistry performed on 18-week human fetal tibia growth plates using antibodies against SHOX2, SHOX, SOX5, SOX6, SOX9 and the negative control (PBS). Specific staining can be observed in the reserve (R), proliferative (P) and hypertrophic (H) zones of the growth plate for all analysed proteins. Images performed at 20 \times magnification.

doi:10.1371/journal.pone.0083104.g005

alteration was detected. Analyses of the Decipher database (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) entries revealed the presence of eight patients with copy number variants (CNVs) of *SHOX2*. The majority of these patients had multiple CNVs located throughout the genome and no common clinical phenotype was observed. Only two patients presented with one large CNV at the *SHOX2* locus, but again no common phenotype was described. As *SHOX2* appears to have a broad expression pattern [17] and the *Shox2*^{-/-} mouse has heart, palate and skeletal defects [20], we postulate that individuals with *SHOX2* defects may present with a more severe phenotype: limb shortening, heart anomalies and/or cleft palate.

In summary, we have demonstrated that *SHOX2*, like *SHOX*, activates *NPPB* directly whilst activation of *ACAN* is through the cooperation with the SOX trio, adding further support to the theory that there is functional redundancy between *SHOX* and *SHOX2* during human embryonic development in a tissue-specific manner.

Supporting Information

File S1 File includes Figures S1–S4 and Tables S1–S5.

Fig. S1: Specificity of the different antibodies employed. A) Immunohistochemical controls performed in 38-wk fetal growth plates and adult normal colon sections: PBS - primary antibody replaced by PBS, Isotype - rabbit polyclonal IgG isotype control antibody, *SHOX2* - *SHOX2* antibody incubated with sections from adult normal colon where this protein is not expected to be expressed. Note the negative staining for the majority of the cells. Images performed at 20× magnification. B) Immunoblots showing the specificity of the *SHOX2* antibody. Nuclear extracts of HEK293 cells overexpressing *SHOX*, *SHOX2*, *SOX5*, *SOX6* and *SOX9* were separated on SDS polyacrylamide gels and probed with anti-*SHOX2*. Anti-GAPDH was used as loading control. Fig. S2: *SHOX2* cooperates with *SOX5* and *SOX9* to activate the *Acan* enhancer. Luciferase reporter activity of U2OS cells transfected with a reporter plasmid containing the *Acan* enhancer, renilla luciferase control plasmid and different combinations of *SHOX*, *SHOX2* WT, *SHOX2*(p.L155V), *SHOX2*(p.Q234X), *SOX5* and *SOX9* expression plasmid as indicated. Fold-increase values were obtained by normalizing the relative luciferase units of each sample with the relative luciferase units of the sample transfected only with the reporter plasmid. All values represent the mean and standard deviation of three independent samples, with each sample assayed in triplicate. Significant p-values <0.001 obtained comparing different inde-

pendent samples are indicated with two asterisks. Fig. S3: Expression of *SHOX2* in different stages of the human fetal growth plate. Immunohistochemistry performed with anti-*SHOX2* antibody in normal fetal growth plates of 18, 27, 32 and 38-weeks. *SHOX2* is expressed in the reserve (R), proliferative (P) and hypertrophic (H) chondrocytes. Images performed at 10× magnification. Fig. S4: *SHOX2* is coexpressed with *SHOX*, *SOX5*, *SOX6* and *SOX9* in the 38-week human fetal growth plate. Immunohistochemistry performed on 38-weeks human fetal tibia growth plates using antibodies against *SHOX*, *SHOX2*, *SOX5*, *SOX6* and *SOX9*. Specific staining can be observed in the reserve (R), proliferative (P) and hypertrophic (H) zones of the growth plate for all the analysed proteins. Images performed at 20× magnification. Table S1: Oligonucleotide sequences for the amplification of the *SHOX2a* cDNA and the cloning of the *SHOX2* constructs. The incorporated enzymes sites are indicated in small letters. *SHOX2a* PCR A antisense oligonucleotide and *SHOX2a* PCR B sense oligonucleotide flank the sequence to be eliminated. Table S2: Oligonucleotide sequences for the generation of various *SHOX2* fragments and *SHOX2* missense mutants. The mutated site is indicated by a small letter. Table S3: Oligonucleotide sequences for the mutation screening of the coding exons and intron/exon boundaries of *SHOX2*. Table S4: Oligonucleotide sequences, PCR conditions and amplicon sizes of the *SHOX2* microsatellite markers. Microsatellites are listed in order from telomere to centromere. Table S5: *SHOX2* self-designed MLPA. Chromosomal and *SHOX2* location, probe lengths and ligation site sequences are indicated for the *SHOX2* and three control fragments. (PDF)

Acknowledgments

We thank all the clinicians and patients who participated in the study; Dr. Shiro Ikegawa and Dr. Toshiyuki Ikeda for the *SOX5* and *SOX6* cDNA clones, respectively and Dr. Veronique Lefebvre for the (4XA1)pCol2Luc plasmid. We also thank Petra Rubio Amado and Raquel Marcos Hernández for help with the immunohistochemistry.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAC VBT AHO ACB KEH. Performed the experiments: MAC VBT AHO AB SBS DGB KEH. Analyzed the data: MAC VBT AHO JIR SBS ACB KEH. Contributed reagents/materials/analysis tools: ACB JIR KEH. Wrote the paper: MAC VBT AHO ACB KEH.

References

- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, et al. (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16: 54–63.
- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, et al. (1998) *SHOX* mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19: 67–69.
- Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, et al. (1998) Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 19: 70–73.
- Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenco-del Blanco D, Aza-Carmona M, et al. (2005) A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of *SHOX* is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 77: 533–544.
- Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE (2007) Compound heterozygosity of *SHOX*-encompassing and downstream *PAR1* deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am J Med Genet A* 143: 933–938.
- Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F, Garavelli L, Varriale L, et al. (2007) The homozygous deletion of the 3' enhancer of the *SHOX* gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin Genet* 72: 490–491.
- Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, et al. (2011) Clinical and molecular evaluation of *SHOX*/*PAR1* duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab* 96(2): 404–12.
- Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Rodríguez-Estevéz A, Rica-Etxebarria I, Gracia R, et al. (2012) Identification of the first *PAR1* deletion encompassing upstream *SHOX* enhancers in a family with idiopathic short stature. *Eur J Hum Genet* 20(1): 125–7.
- Benito-Sanz S, Royo JL, Barroso E, Paumard-Hernández B, Barreda-Bonis AC, et al. (2012) Identification of the first recurrent *PAR1* deletion in Leri-Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel *SHOX* enhancer. *J Med Genet* 49(7): 442–50.
- Nicolosi A, Caruso-Nicoletti M (2011) Epidemiology of *SHOX* deficiency. *J Endocrinol Invest* 33(6 Suppl): 7–10.
- Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, et al. (1998) *SHOT*, a *SHOX*-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5): 2406–11.
- Marchini A, Häcker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, et al. (2007) BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene *SHOX*. *Hum Mol Genet* 16: 3081–3087.
- Decker E, Durand C, Bender S, Rödelserperger C, Glaser A, et al. (2011) *FGFR3* is a target of the homeobox transcription factor *SHOX* in limb development. *Hum Mol Genet* 20(8): 1524–35.

14. Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, et al. (2011) SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* 20(8): 1547–59.
15. Kmita M, Tarchini B, Zákány J, Logan M, Tabin CJ, et al. (2005) Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435(7045): 1113–6.
16. Durand C, Decker E, Roeth R, Schneider KU, Rappold G (2012) The homeobox transcription factor HOXA9 is a regulator of SHOX in U2OS cells and chicken micromass cultures. *PLoS One* 7(9): e45369.
17. Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, et al. (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 695–702.
18. Tiecke E, Bangs F, Blaschke R, Farrell ER, Rappold G, et al. (2006) Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol* 298: 585–596.
19. Munns CJ, Haase HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, et al. (2004) Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8): 4130–5.
20. Yu L, Gu S, Alappat S, Song Y, Yan M, et al. (2005) Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* 132(19): 4397–406.
21. Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuiper S, Just S, Wisse LJ, et al. (2007) Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaker development. *Circulation* 115(14): 1830–8.
22. Espinoza-Lewis RA, Yu L, He F, Liu H, Tang R, et al. (2009) Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Dev Biol* 327(2): 376–85.
23. Puskarić S, Schmitteckert S, Mori AD, Glaser A, Schneider KU, et al. (2010) Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Hum Mol Genet* 19(23): 4625–33.
24. Espinoza-Lewis RA, Liu H, Sun C, Chen C, Jiao K, et al. (2011) Ectopic expression of Nkx2.5 suppresses the formation of the sinoatrial node in mice. *Dev Biol* 356(2): 359–69.
25. Cobb J, Dierich A, Huss-Garcia Y, Duboule D (2006) A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12): 4511–5.
26. Bobick BE, Cobb J (2012) Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *J Cell Sci* 125(24): 6071–83.
27. Yu L, Liu H, Yan M, Yang J, Long F, et al. (2007) Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* 306(2): 549–59.
28. Liu H, Chen CH, Espinoza-Lewis RA, Jiao Z, Sheu I, et al. (2011) Functional redundancy between human SHOX and mouse Shox2 genes in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaker function. *J Biol Chem* 286(19): 17029–38.
29. Han Y, Lefebvre V (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* 28: 4999–5013.
30. Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, et al. (2001) The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* 10: 3083–3091.
31. Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, et al. (2002) Curvas y Tablas de crecimiento (Estudios Longitudinal y Transversal). In: Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre Bilbao. pp. 1–36.
32. Benito-Sanz S, Gorbenko-del Blanco D, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, et al. (2006) Characterization of SHOX deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. *Am J Hum Genet* 79: 409–414.
33. Benito-Sanz S, del Blanco DG, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, et al. (2006) PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat* 27(10): 1062.
34. Nicolaides NC, Stoeckert CJ Jr (1990) A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells. *Biotechniques* 8: 154–156.
35. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, et al. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1: 277–290.
36. Wilson D, Sheng G, Lecuit T, Dostatni N, Desplan C (1993) Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* 7(11): 2120–34.
37. Schneider KU, Marchini A, Sabherwal N, Röth R, Niesler B, et al. (2005) Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill Dyschondrosteosis. *Hum Mut* 26(1): 1–9.
38. Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B (2001) L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A: S69–75.
39. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V, French SHOX GeNeSIS Module (2006) High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet* 43: 735–739.
40. Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Roeth R, Weiss B, et al. (2009) Enhancer mutations of the SHOX gene as a frequent cause of short stature – the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* 46: 834–839.
41. Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, et al. (1998) Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci* 95: 2337–2342.
42. Maisel A, Mueller C, Adams K Jr, Anker SD, Aspromonte N, et al. (2008) State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* 10(9): 824–39.
43. Grueneberg DA, Simon KJ, Brennan K, Gilman M (1995) Sequence-specific targeting of nuclear signal transduction pathways by homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 15(6): 3318–26.
44. Wolberger C (1996) Homeodomain interactions. *Curr Opin Struct Biol* 6(1): 62–8.
45. Wissmüller S, Kosian T, Wolf M, Finzsch M, Wegner M (2006) The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res* 34: 1735–1744.
46. Li T, Stark MR, Johnson AD, Wolberger C (1995) Crystal structure of the MATA1/MATA2 homeodomain heterodimer bound to DNA. *Science* 270(5234): 262–9.
47. Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CI Jr, et al. (2002) Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 110(2): 158–63.
48. Semina EV, Reiter RS, Murray JC (1998) A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Hum Mol Genet* 7(3): 415–22.

SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer

Miriam Aza-Carmona^{1,2}, Debbie J. Shears^{3,4}, Patricia Yuste-Checa^{1,2},
Verónica Barca-Tierno^{1,2}, Alfonso Hisado-Oliva^{1,2}, Alberta Belinchón^{1,2},
Sara Benito-Sanz^{1,2}, J. Ignacio Rodríguez⁵, Jesús Argente^{6,7}, Ángel Campos-Barros^{1,2},
Peter J. Scambler³ and Karen E. Heath^{1,2,*}

¹Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto Carlos III, Madrid, Spain, ³Molecular Medicine Unit, University College Institute of Child Health, London, UK, ⁴Department of Clinical Genetics, Churchill Hospital, Oxford, UK, ⁵Department of Pathology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, ⁶Department of Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación La Princesa, and Department of Pediatrics, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain and ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología, Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Received November 29, 2010; Revised and Accepted January 20, 2011

SHOX (short stature homeobox-containing gene) encodes a transcription factor implicated in skeletal development. SHOX haploinsufficiency has been demonstrated in Leri–Weill dyschondrosteosis (LWD), a skeletal dysplasia associated with disproportionate short stature, as well as in a variable proportion of cases with idiopathic short stature (ISS). In order to gain insight into the SHOX signalling pathways, we performed a yeast two-hybrid screen to identify SHOX-interacting proteins. Two transcription factors, SOX5 and SOX6, were identified. Co-immunoprecipitation assays confirmed the existence of the SHOX–SOX5 and SHOX–SOX6 interactions in human cells, whereas immunohistochemical studies demonstrated the co-expression of these proteins in 18- and 32-week human fetal growth plates. The SHOX homeodomain and the SOX6 HMG domain were shown to be implicated in the SHOX–SOX6 interaction. Moreover, different SHOX missense mutations, identified in LWD and ISS patients, disrupted this interaction. The physiological importance of these interactions was investigated by studying the effect of SHOX on a transcriptional target of the SOX trio, *Agc1*, which encodes one of the main components of cartilage, aggrecan. Our results show that SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the upstream *Agc1* enhancer and that SHOX mutations affect this activation. In conclusion, we have identified SOX5 and SOX6 as the first two SHOX-interacting proteins and have shown that this interaction regulates aggrecan expression, an essential factor in chondrogenesis and skeletal development.

INTRODUCTION

SHOX (short stature homeobox-containing gene) is located in the pseudoautosomal region 1 (PAR1) of the X and Y

chromosomes (1,2). Mutations and deletions of *SHOX* and/or the downstream PAR1 containing *SHOX* enhancer elements have been reported in Leri–Weill dyschondrosteosis (LWD, MIM 127300), Langer mesomelic dysplasia (LMD, MIM

*To whom correspondence should be addressed at: Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Pº Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. Tel: +34 917277469; Fax: +34 912071040; Email: kheath.hulp@salud.madrid.org

249700) and idiopathic short stature (ISS, MIM 300582) (1,3–8). LWD is a skeletal dysplasia associated with disproportionate short stature due to mesomelic shortening of the limbs, and the characteristic abnormality of the forearms known as Madelung deformity: bowing of the radius and dorsal dislocation of the distal ulna. Alterations in *SHOX* or its enhancers (*SHOX/*PAR1) have been identified in ~60% of LWD individuals (9–11). LMD is due to homozygous or compound heterozygous *SHOX/*PAR1 alterations resulting in severely disproportionate short stature with marked mesomelic and rhizomelic limb shortening. *SHOX/*PAR1 alterations have also been found in ~5% of ISS cases (11), a condition defined as a height below –2 SDS in the absence of known specific causative disorders (12). Together, the estimated prevalence of *SHOX* haploinsufficiency is 1 in 1000 individuals.

However, there is some evidence suggesting genetic heterogeneity in LWD: first, the molecular defect in 40% of LWD cases remains unknown (9–11), and secondly, the PAR1 has been excluded by linkage analysis as the causative region in a multigenerational LWD family (S. Benito-Sanz *et al.*, unpublished data).

Two *SHOX* isoforms exist, *SHOXa* and *SHOXb* (1), both contain a homeodomain, but only *SHOXa* (*SHOX*) acts as a transcriptional activator in osteogenic cells via its transactivation domain, the OAR (otp, aristaless and rax), which is absent in *SHOXb*. Recently, *NPPB*, which encodes brain natriuretic peptide, an important regulator of endochondral ossification, has been identified as the first transcriptional target of *SHOX* (13).

There is robust evidence in the literature for the implication of *SHOX* in chondrogenesis: (i) *SHOX* is expressed in the middle part of the developing human limbs during chondrogenesis, from the condensing mesenchyme forming the precartilaginous structure of the bone to the start of ossification (14); (ii) *Shox* overexpression promoted chondrogenesis in chicken micromass cultures, observed by the increased expression of *Col2a1* and *Agl1*, which encode the cartilage matrix components collagen type II and aggrecan, respectively, and by the enhanced Alcian blue staining (15); and (iii) *SHOX* overexpression induces growth arrest and apoptosis in human primary chondrocytes (16). Despite these recent advances, the precise role of *SHOX* in bone development still remains elusive.

In order to identify the signalling pathways in which *SHOX* intervenes and to discover potential gene candidates involved in the pathogenesis of LWD, a yeast two-hybrid screen of a whole mouse embryo cDNA library was performed using *SHOX* as bait. Among the large number of potential *SHOX* interactors, we identified two transcription factors, Sox5 and Sox6, which together with Sox9 form the Sox trio, the master complex of chondrogenesis (17). We confirmed that the human SOX5 and SOX6 homologues also interact with *SHOX* and demonstrated that *SHOX* missense mutations impair the *SHOX*–SOX6 interaction. Interestingly, we also showed that *SHOX* cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agl1* enhancer and that *SHOX* mutations impair this activation. In summary, we have identified and characterized SOX5 and SOX6 as the first two *SHOX*-interacting proteins and defined a function for this protein complex during chondrogenesis.

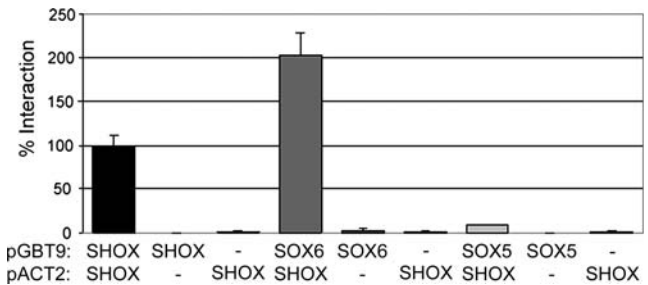


Figure 1. *SHOX* interacts with SOX5 and SOX6 in the yeast two-hybrid system. The *S. cerevisiae* strain Y187 was cotransformed with the pGBT9 and pACT2 vectors. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by using a β -galactosidase liquid assay with CRPG as substrate. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different construct combinations to that of *SHOX* homodimerization (black bar). Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformation experiments, each performed in triplicate.

RESULTS

Identification of two *SHOX*-interacting proteins

In order to identify proteins which interact with *SHOX*, a whole mouse embryo 9.5–10.5 dpc cDNA library was screened in a yeast two-hybrid system with full-length *SHOX* cDNA as bait. A total of 36 positive colonies were identified. The plasmids containing the cDNA sequence of the putative *SHOX* interaction partners were extracted from the cotransformed PJ69-4A yeast cells, transformed into *Escherichia coli* cultures and sequenced. BLAST searches of the sequences of all positive colonies were performed against EMBL (www.ebi.ac.uk/embl) and SPTR (www.uniprot.org) databases and Unigene clusters (www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene). Twelve of the positive clones (33%) were excluded from further analysis because they lacked biological sense (i.e. the cDNA sequence was out of frame or corresponded to untranslated regions). The remaining 24 positive clones (67%) encoded full-length, or almost full-length, in-frame cDNA inserts. Three of the 24 positive cDNAs (12.5%) corresponded to *Sox5* and *Sox6*, two transcription factors involved in chondrogenesis (18,19). The detected interactions were first validated by means of a bait/prey switch, placing the full-length *SHOX* cDNA in the pVP16 vector and the *Sox5* and *Sox6* cDNA fragments into the pGBDU vector (data not shown). The interactions between the respective proteins were confirmed using SOX5 and SOX6, the human homologues of Sox5 and Sox6. For this purpose, we cloned the human full-length homologue SOX5 and SOX6 cDNAs into the pGBT9 vector and cotransformed them into the yeast cells with pACT2:SHOX. *SHOX* homodimerization was used as a positive control (20). Both human SOX5 and SOX6 interacted with *SHOX* (Fig. 1).

Confirmation of the *SHOX*–SOX5 and *SHOX*–SOX6 interactions

Confirmation of the identified interactions was subsequently performed using coimmunoprecipitation in human cells and immunohistochemical analysis in human fetal growth plates.

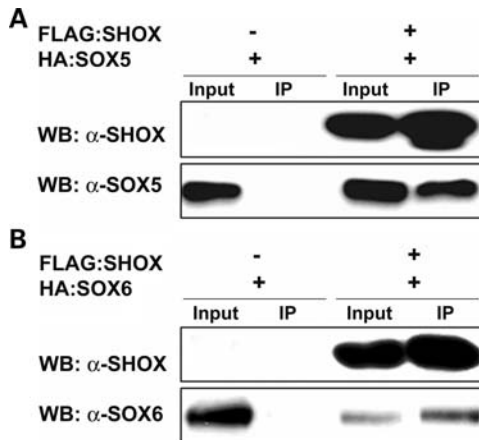


Figure 2. SHOX interacts with SOX5 and SOX6 in human cells. Nuclear extracts of HEK293 cells overexpressing FLAG:SHOX and HA:SOX5 (A) or FLAG:SHOX and HA:SOX6 (B) were immunoprecipitated using anti-FLAG-agarose. Western blots (WB) of immunoprecipitates were probed with SHOX, SOX5 and SOX6 antibodies. Nuclear extracts corresponding to 10% input were included as protein expression controls, and nuclear extract immunoprecipitates of cells transfected only with HA:SOX5 (A) or HA:SOX6 (B) were included as negative controls. The western blot images clearly show that SOX5 and SOX6 immunoprecipitates only in the presence of SHOX.

SHOX interacts with SOX5 and SOX6 in human cells. Nuclear lysates of human HEK293 cells overexpressing the proteins of interest were immunoprecipitated with anti-FLAG-agarose beads and analysed by western blot using SHOX, SOX5 and SOX6 antibodies. In agreement with the yeast two-hybrid experiments, SOX5 and SOX6 coprecipitated with SHOX (Fig. 2), confirming the interaction between these proteins in human cells.

SHOX, SOX5 and SOX6 are coexpressed in 18- and 32-week human fetal growth plates. By immunohistochemistry, we observed the expression of all three proteins in the reserve, proliferative and hypertrophic zones of both gestational ages (Fig. 3, Supplementary material, Figs S1 and S2). Since SOX5 and SOX6 cooperate with SOX9 during chondrogenesis (17) and Sox9 is needed for Sox5 and Sox6 expression (21), we analysed and subsequently confirmed that SOX9 is coexpressed with SHOX, SOX5 and SOX6 in the same zones of both growth plates (Fig. 3, Supplementary material, Figs S1 and S2). These findings provide the first evidence of coexpression of SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 in the human fetal growth plate.

SHOX domains involved in the interaction with SOX6

Since Sox5 and Sox6 have been shown to be highly homologous and functionally redundant (18,19), and in yeast, the SHOX–SOX6 interaction was stronger than SHOX–SOX5, we characterized the domains implicated in the SHOX–SOX5/SOX6 interaction using SOX6 and a series of SHOX domain constructs. Four SHOX constructs, SHOX(1–178), SHOX(1–211), SHOX(117–274) and SHOX(117–292), all of which include the homeodomain, were shown to interact with SOX6 (Fig. 4), thus suggesting that this domain is

implicated in the SHOX–SOX6 interaction. However, the SHOX construct containing only the homeodomain, SHOX(117–178), did not interact with SOX6 (Fig. 4). Thus, either the N- and/or the C-terminal region may participate in the SHOX–SOX6 interaction or may confer structural stability in yeast to the interacting domain, the homeodomain.

SHOX mutants impair the SHOX–SOX6 interaction

To further characterize the interaction between SOX6 and SHOX, we expressed 10 SHOX missense mutations (Fig. 5A) in the pACT2 vector and tested their capacity to bind SOX6 in cotransformation experiments with wild-type SOX6 in the pGBT9 vector. Seven of these mutations, located in the N-terminus or the homeodomain, have been previously reported in patients with LWD or ISS (Fig. 5A; www.hd-lovd.uni-hd.de/). Since no missense mutation in the C-terminal region of SHOX had been described at the time of the assay design, we generated three artificially SHOX mutant proteins, R195P, A233E and D278A, which substitute highly conserved amino acids in the C-terminal region with structurally different residues. Eight missense mutations have since been described in the SHOX C-terminal region (www.hd-lovd.uni-hd.de/), two affecting residues that we targeted: R195N and A233V. All analysed mutant SHOX proteins which failed to bind SOX6 (L132V, R168W, A170P and R173C) harboured mutations located in the homeodomain region (Fig. 5A and B), thus confirming that the SHOX homeodomain is directly involved in the interaction with SOX6. Interestingly, the homeodomain mutation R153L did not impair the ability of SHOX to bind SOX6 (Fig. 5A and B). The N-terminal mutation K116E caused a 60% reduction in the interaction with SOX6 (Fig. 5B), suggesting that this residue, close to the homeodomain boundary, may either participate in the interaction or confer structural stability to the homeodomain. The three mutations located in the C-terminal region caused a milder reduction (25–40%) in SHOX interaction with SOX6 (Fig. 5B). In conclusion, our results indicate that mutations in the SHOX homeodomain, except R153L, affect the interaction with SOX6, confirming that this domain is critical for the interaction with SOX6.

SOX6 domains involved in the interaction with SHOX

To characterize the SOX6 domain involved in the interaction with SHOX, we generated a series of SOX6 cDNA deletion constructs in the pGBT9 vector and used them in cotransformation experiments with the wild-type SHOX in the pACT2 vector (Fig. 6A). Two constructs, SOX6(263–787) and SOX6(479–787), both of which share the DNA-binding HMG domain, interacted with SHOX (Fig. 6), indicating that this domain is directly involved in the interaction with SHOX. The construct containing the HMG domain, SOX6(479–787), interacted with SHOX more weakly than SOX6(263–787), suggesting that the second coiled-coil may also participate in the interaction, although it is unable to interact alone, or, alternatively, it may confer structural stability in yeast to the true interacting domain, the HMG domain.

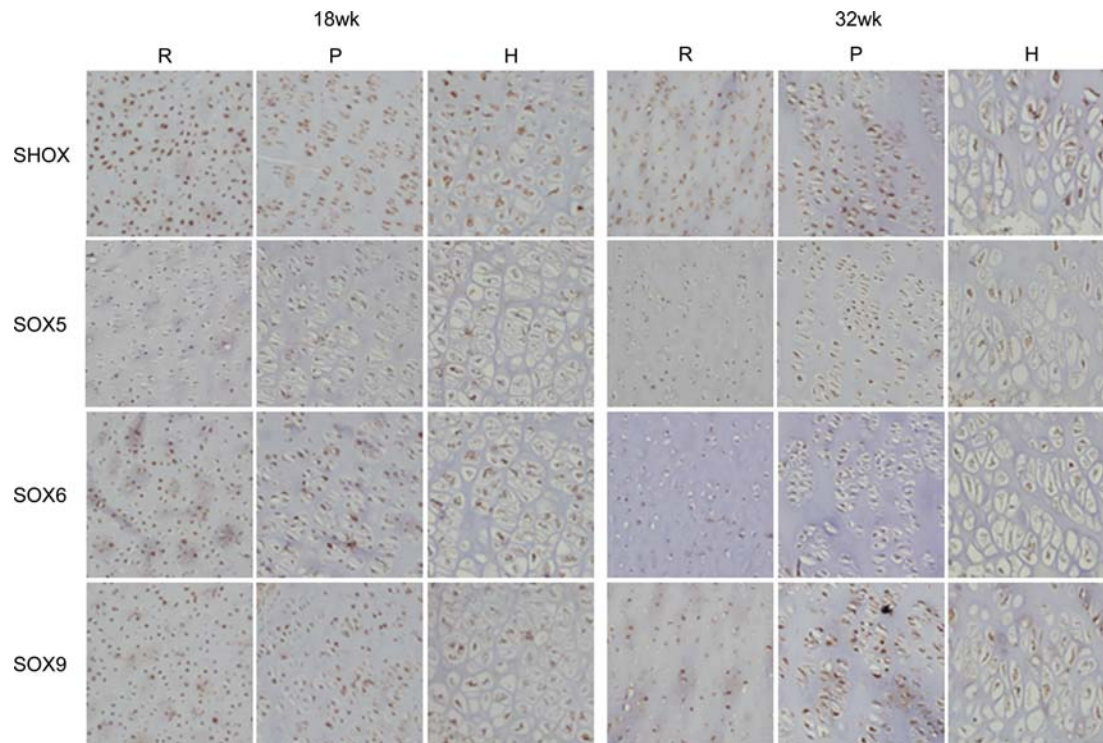


Figure 3. SHOX is coexpressed with SOX5, SOX6 and SOX9 in the human fetal growth plate. Immunohistochemistry performed on 18- and 32-week human fetal tibia growth plates. DAB immunostaining at 20 \times magnification against SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 antibodies in 18- and 32-week fetal growth plates. Specific staining can be observed in the reserve, proliferative and hypertrophic zones of the growth plate for the four proteins.

SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agc1* enhancer

In order to assess the physiological significance of the SHOX–SOX5 and SHOX–SOX6 interactions, we investigated their capacity to transactivate SOX trio target genes. The SOX trio has been shown to induce aggrecan expression, a marker of chondrocyte differentiation, by activating the *Agc1* enhancer (22). It has also been observed that *Shox* overexpression increased *Agc1* expression in chicken micromass cultures (15), thus suggesting that *Shox* is involved in the expression of *Agc1*.

To examine whether SHOX participates in the expression of *Agc1*, we performed a luciferase assay in U2OS cells. The osteogenic cells were cotransfected with different combinations of SHOX, SOX5/SOX6 and SOX9 expression plasmids and a luciferase reporter plasmid containing four tandem copies of the far-upstream *Agc1* enhancer followed by the *Col2a1* –89 to +6 promoter (22) (kind gift of V. Lefebvre). Coexpression of SHOX with the three SOX proteins was not undertaken as no significant increase in aggrecan expression was previously observed compared with the coexpression of SOX5 or SOX6 with SOX9 (22). Western blot analysis was performed to ensure the expression of the various proteins (data not shown). As described previously, SOX9 overexpression was able to induce the *Agc1* enhancer (22), and coexpression of SOX5 or SOX6 and SOX9 highly activated this enhancer (Fig. 7). In contrast, the coexpression of SHOX with SOX5/SOX6 was unable to induce the *Agc1* enhancer (Fig. 7) and the addition of SHOX did not improve

the transcriptional capacity of SOX9. Interestingly, overexpression of SHOX, SOX5/SOX6 and SOX9 increased the activation of the *Agc1* enhancer (Fig. 7A and B), from which we conclude that SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the upstream *Agc1* enhancer.

Subsequently, we studied whether SHOX mutants impaired the *Agc1* enhancer activation. The SHOX Q211X mutant, previously denominated as SHOX(1–211) (Fig. 4), failed to activate the *Agc1* enhancer (Fig. 8A and B), whereas L132V and R168W mutants showed a decreased ability to activate the enhancer (Fig. 8A and B). Once again, the SHOX R153L mutant behaved differently when compared with the other homeodomain mutants, retaining its ability to activate the *Agc1* enhancer at levels similar to wild-type SHOX (Fig. 8).

SOX5 and SOX6 mutation screening in LWD individuals without SHOX/PAR1 alterations

In order to explore the involvement of SOX5 and SOX6 in the molecular aetiology of LWD, we undertook mutation screening of the coding regions and intron/exon boundaries of SOX5 and SOX6 in 37 individuals with definite or possible LWD without a known molecular defect. No SOX5 or SOX6 point mutations, small deletions or insertions were identified in this cohort. The probability of complete or intragenic SOX5 deletions was reduced in 36 patients, through the observation of two alleles for a microsatellite marker located in the 5'-flanking region of SOX5, and/or nine intragenic single-nucleotide polymorphisms (SNPs): c.231 + 53 C > A,

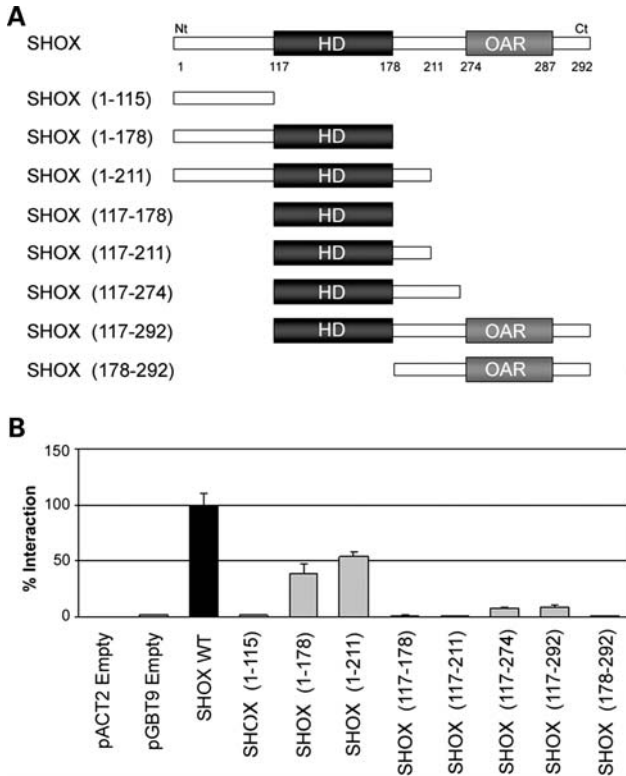


Figure 4. Characterization of the SHOX domains involved in the interaction with SOX6 using the yeast two-hybrid assay. (A) SHOX is schematically drawn showing the amino acid location of the homeodomain (HD) and the OAR domain. The various SHOX fragments, indicating the name of each construct and the amino acids that they contain, are depicted below SHOX. (B) Yeast two-hybrid assay of Y187 cells cotransformed with SOX6 in the pGBT9 vector and different SHOX fragments in the pACT2 vector. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by performing a β -galactosidase liquid assay. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SHOX construct–SOX6 combinations to that obtained with the wild-type SHOX–SOX6 interaction (black bar). Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformant colonies, with each colony assayed in triplicate.

rs7980561, rs11047075, c.771 + 118 G > A, rs11047034, rs1479452, rs7485662, rs76722400 and rs4636755. The probability of the existence of complete or partial *SOX6* deletions was reduced in 32 patients by a self-designed MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) assay and/or by the presence in heterozygosity of at least one of the observed intragenic SNPs: rs4617548, c.1733-41 C > T and c.2183 + 7 A > G.

DISCUSSION

In this work, we identified SOX5 and SOX6 as SHOX-interacting proteins using a yeast two-hybrid assay and confirmed the findings by coimmunoprecipitation in human cells and immunohistochemistry in human fetal growth plates. The domains involved in the SHOX–SOX6 interaction were characterized using protein fragments and a series of SHOX mutants. These experiments revealed that the SHOX

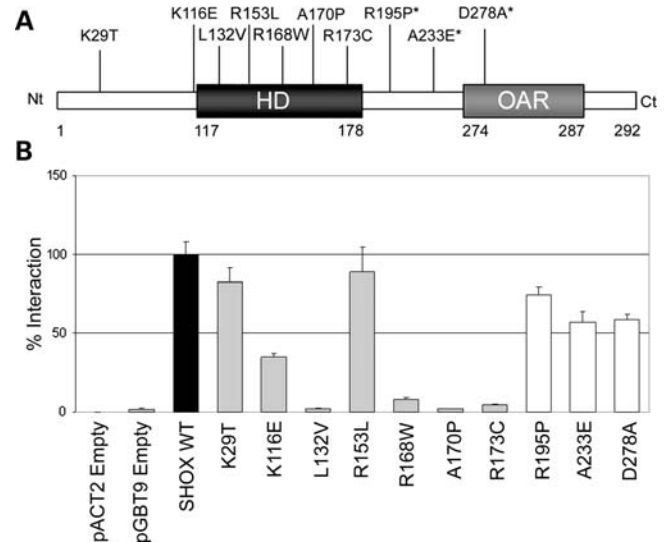


Figure 5. SHOX mutants impair the SHOX–SOX6 interaction. (A) SHOX protein structure scheme showing the homeodomain (HD) and the OAR domain. The 10 missense mutations analysed in this study are indicated. Mutations not reported in patients with LWD or ISS are marked with an asterisk. (B) Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with SOX6 in the pGBT9 vector and the different SHOX mutants in the pACT2 vector. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by performing a β -galactosidase liquid assay. Protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the various SHOX mutant–SOX6 combinations to the wild-type SHOX–SOX6 interaction (black bar). The grey bars correspond to the mutations reported in LWD or ISS patients and the white bars indicate the mutations that have not been reported in LWD/ISS individuals and that were created by us. Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformant colonies, with each colony assayed in triplicate.

homeodomain interacts with the HMG domain of SOX6. Our data are therefore consistent with previous reports, where the Sox HMG domain has been shown to interact with the DNA-binding domain of several transcription factors (23). However, we cannot discard that the N- and C-terminal regions of SHOX and the SOX6 second coiled-coil are also implicated in the SHOX–SOX6 interaction, at least conferring structural stability to the interacting domains.

Four of the five analysed SHOX homeodomain mutants failed to interact with SOX6, whereas, interestingly, the R153L mutation retained its binding ability. This is the only analysed mutation in helix II of the homeodomain, suggesting that helix II does not participate in the interaction with SOX6 or that this change does not affect the interaction with SOX6. The SHOX mutants located outside of the homeodomain showed a variable reduction in their interaction ability, suggesting that the conformation of the SHOX protein may be important for the interaction with SOX5 and SOX6.

Both Sox5 and Sox6 are essential for chondrogenesis (24), cooperating with Sox9 to form the Sox trio, which has been shown to directly activate three genes encoding extracellular matrix proteins: *Col2a1* (25), *Agl1* (22) and *Comp* (26). However, it has been suggested that additional unknown transcription factors work together with the Sox trio to promote chondrocyte overt differentiation (17). Little is known about the function and signalling pathways in which SHOX

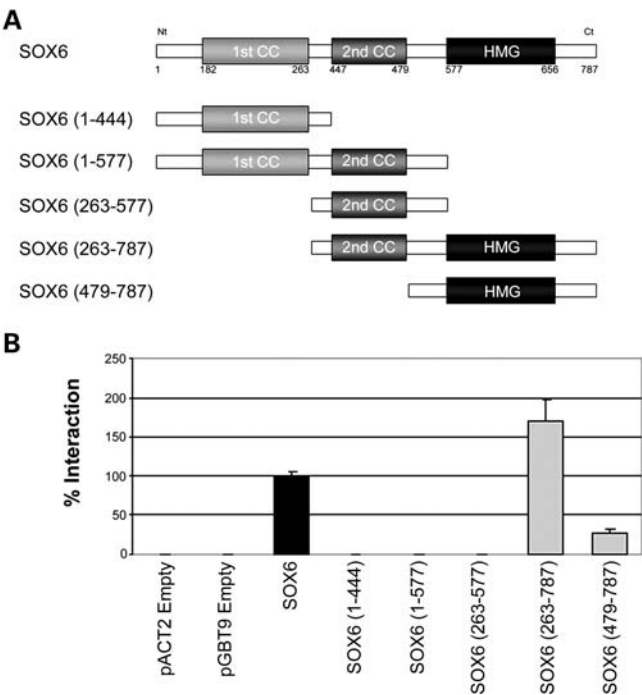


Figure 6. Characterization of SOX6 domains involved in the interaction with SHOX using the yeast two-hybrid assay. **(A)** SOX6 is schematically drawn showing the amino acid location of two dimerization domains, the first and the second coiled-coils (1st cc and 2nd cc, respectively), and a DNA-binding domain, the HMG domain. Depicted below are the SOX6 generated constructs, indicating the name of each fragment by the amino acids which they contain. **(B)** Yeast two-hybrid assay of Y187 cotransformed cells with the different SOX6 fragments in the pGBT9 vector and SHOX in the pACT2 vector. Yeast cells were selected on SD growth medium lacking Trp and Leu. Interactions were determined by performing a β -galactosidase liquid assay. The protein interaction percentages were obtained by normalizing the β -galactosidase units of the different SOX6 fragment–SHOX combinations to that obtained with the wild-type SOX6–SHOX interaction (black bar). Empty vectors were employed as negative controls. All values represent the mean and the standard deviation of five independent transformant colonies, with each colony assayed in triplicate.

intervenes but it has been observed that *Shox* overexpression promotes chondrogenesis in chicken micromass cultures, shown by increased *Col2a1* and *Agc1* expression (15). These observations prompted us to study the role of SHOX–SOX5 and SHOX–SOX6 interactions in the regulation of the SOX trio transcriptional target, *Agc1*. SHOX was shown to cooperate with SOX5/SOX6 and SOX9, significantly activating the transcriptional activity of the *Agc1* enhancer.

This cooperation was impaired by SHOX mutants which altered the transcriptional activity of the *Agc1* enhancer. SHOX mutants that were unable to interact with SOX6, such as the homeodomain mutants L132V and R168W, also altered the transcriptional activity of the *Agc1* enhancer. In contrast, the R153L homeodomain mutant retained its ability to bind to SOX6 and activate the *Agc1* enhancer, but failed to transactivate *NPPB* (13), thus suggesting that the molecular mechanism by which SHOX transactivates *NPPB* and *Agc1* is different. These results suggest that the SHOX–SOX6 interaction is important for the activation of the *Agc1* enhancer. However, since the L132V and R168W mutants cannot dimerize to SHOX or bind DNA, and the R153L mutant

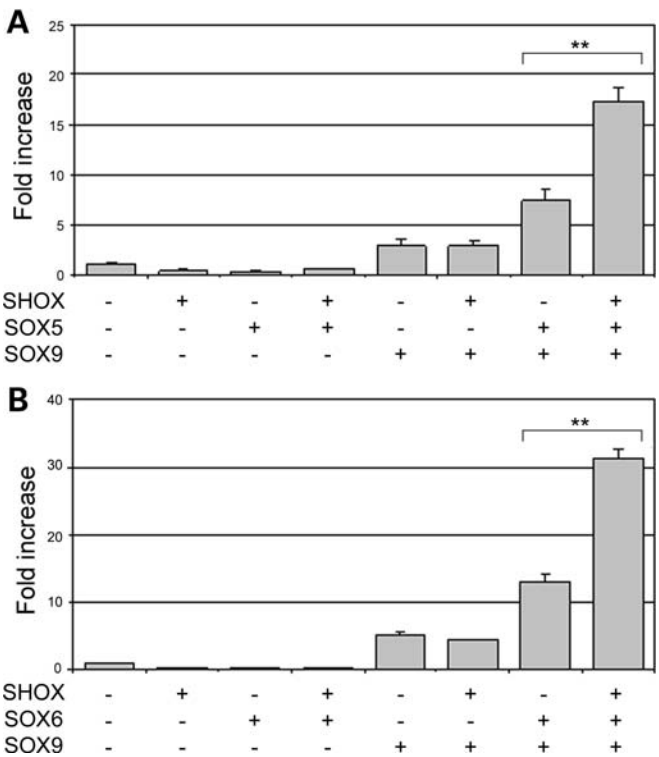


Figure 7. SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agc1* enhancer. Luciferase reporter activity of U2OS cells transfected with the (4XA1)pCol2Luc reporter plasmid, renilla luciferase control plasmid and different combinations of the SHOX, SOX5 and SOX9 **(A)**; or SHOX, SOX6 and SOX9 **(B)** expression plasmids as indicated below the graph. Fold-increase values were obtained by normalizing the relative luciferase units of each sample with the relative units of the sample that was transfected with the reporter plasmid alone. All values represent the mean and the standard deviation of three independent samples, with each sample assayed in triplicate. $^{**}P < 0.001$ compared with the SOX5:SOX9 and SOX6:SOX9 transfections, respectively.

conserves these abilities (27), we cannot exclude the possibility that the L132V and R168W mutants failed to activate the *Agc1* enhancer because they lost their capacity to transactivate. The SHOX mutant Q211X, which lacks the OAR domain, conserved its interaction capacity with SOX6 (50%), but failed to activate the *Agc1* enhancer, thus indicating that the transactivation domain of SHOX is necessary for the activation of the *Agc1* enhancer. Despite these molecular findings, the phenotype observed in individuals with these four mutants is indifferent, presenting predominantly as LWD but in a few cases as ISS.

We searched for the presence of SHOX-binding sequences, i.e. P2–P6 elements, in the *Agc1* enhancer. No P2–P6 element sequence with $>75\%$ identity to the consensus sequence of other homeodomain proteins was detected (Jaspar database, www.jaspar.genereg.net/). However, no perfect binding site was found in the SHOX-binding region of the *NPPB* promoter (13), suggesting that SHOX may bind, *in vivo*, to an imperfect P element in the *Agc1* enhancer. In support of this hypothesis, we excluded the possibility that SHOX acts as a connecting protein between SOX5/SOX6 and SOX9 by coimmunoprecipitation (Supplementary material, Fig. S3). Thus, we propose that the SHOX homeodomain interacts

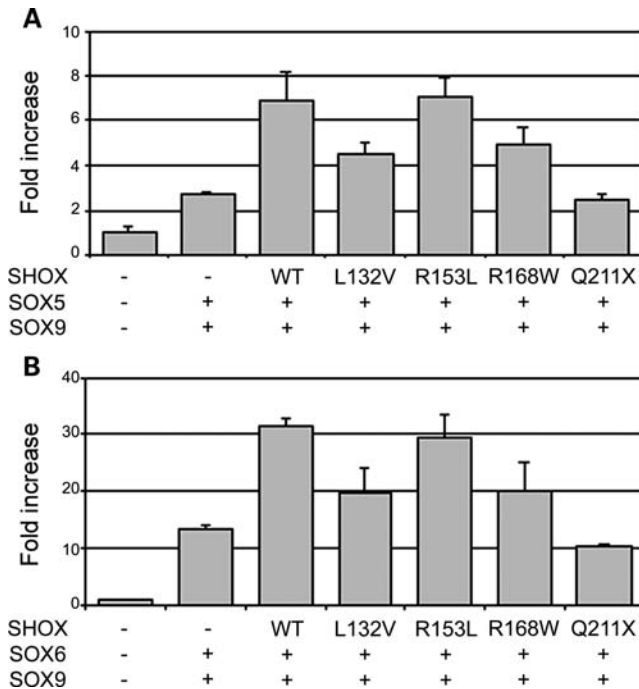


Figure 8. SHOX mutants affect the activation of the *Agc1* enhancer. Luciferase reporter activity of U2OS cells transfected with the (4XA1)pCol2Luc reporter plasmid, renilla luciferase control plasmid and different combinations of the SOX5 (A) or SOX6 (B), SOX9, SHOX wild-type and mutant expression plasmids as indicated below the graph. Fold-increase values were obtained by normalizing the relative luciferase units of each sample with the relative units of the sample which was transfected with the reporter plasmid alone. All values represent the mean and the standard deviation of three independent samples, with each sample assayed in triplicate.

with the SOX5/SOX6 HMG domain, whereas SOX5/SOX6 and SOX9 are bound to the *Agc1* enhancer and SHOX may or may not be bound to this regulatory region.

We also showed that SHOX, SOX5, SOX6 and SOX9 are coexpressed in resting, proliferative and hypertrophic chondrocytes of the 18- and 32-week human fetal growth plates. Our data are not concordant with the *Sox5*, *Sox6* and *Sox9* mRNA expression data reported in mouse embryos, where *Sox5*, *Sox6* and *Sox9* were turned off upon chondrocyte prehypertrophy (25). However, immunohistochemical staining of tibia growth plate sections of an E16 mouse fetus (Supplementary material, Fig. S4) and previously described immunohistochemistry assays performed in E17.5 mouse fetal growth plates (28) confirmed that *Sox5*, *Sox6* and *Sox9* proteins are also expressed in mouse hypertrophic chondrocytes.

Both models of three null allele *Sox5* and *Sox6* knockout mice had short and bent forelimbs (19), showing some similarities to the phenotype observed in LWD, thus suggesting that *Sox5* and *Sox6* could be alternative genes implicated in this aetiology. However, mutation screening of *SOX5* and *SOX6* coding regions did not detect any mutation in the studied cohort. Analysis of a larger cohort and mutation screening of the *SOX5* and *SOX6* regulatory regions are necessary to properly assess their involvement in this pathology.

In conclusion, our work has identified the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 as the two first SHOX-

interacting proteins and has shown that SHOX cooperates with SOX5/SOX6 and SOX9 in the activation of the *Agc1* enhancer that regulates the expression of aggrecan, an essential extracellular matrix component of cartilage. Our work provides an insight into the function of SHOX and improves our knowledge about chondrogenesis and skeletal development.

MATERIALS AND METHODS

Generation of recombinant constructs

The full-length cDNA of *SHOX* (NM_000451), *SOX5* (NM_152989), *SOX6* [corresponding to a splicing variant highly expressed in chondrocytes and lacking exon 9 but including exon 14a, using the exonic nomenclature described by Cohen-Barak *et al.* (29), and kindly donated by Dr T. Ikeda] and *SOX9* (NM_000346) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) using appropriate oligonucleotides (Table 1) and TA cloning (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Full-length *SHOX* cDNA was first subcloned into the pEG202 expression vector (Clontech) and then shuttled into the yeast expression vector pGBDU (kindly donated by Dr Stan Hollenberg, Vollum Institute, OR, USA). *SHOX* cDNA was also subcloned into the yeast expression vector pACT2 (Clontech) and the mammalian expression vectors pcDNA3-FLAG and pcDNA3-HA (Invitrogen). *SOX5* and *SOX6* cDNAs were subcloned into the yeast expression vector pGBT9 (Clontech) and into the mammalian expression vector pcDNA3-HA (Invitrogen), as was *SOX9* cDNA. *SOX6* cDNA was also subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3-FLAG (Invitrogen). Various *SHOX* and *SOX6* fragments were also inserted into the TA cloning vector using appropriate oligonucleotides (Table 1) and subsequently subcloned into the vectors pACT2 and pGBT9, respectively. The introduction of the *SHOX* missense mutations and the generation of some *SHOX* and *SOX6* fragments were performed using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), appropriate mutagenic oligonucleotides (Table 2) and different plasmids as templates. All expression constructs were sequenced to exclude the presence of undesired mutations resulting from PCR amplification. The previously reported *Agc1* enhancer plasmid (4XA1)pCol2Luc (22) was kindly donated by Dr Veronique Lefebvre. This consisted of four tandem repeats of a 359 bp cartilage-specific enhancer, which starts 9477 bp upstream the *Agc1* mouse transcription start site (4XA1), followed by -89 to +6 *Col2a1* promoter (pCol2) driving the expression of the firefly luciferase gene (Luc).

Yeast two-hybrid screens

We used the pGBDU:SHOX full length as bait, a whole mouse embryo 9.5–10.5 dpc random primed cDNA library in pVP16 (kindly donated by Dr Stan Hollenberg, Vollum Institute, OR, USA) and the *Saccharomyces cerevisiae* strain PJ69-4A. In brief, yeast cells containing the bait plasmid were transformed with the cDNA library using the LiAc/ssDNA/PEG-heat shock protocol following the manufacturer's instructions (Matchmaker Yeast Protocol Handbook, Clontech). We screened

Table 1. Oligonucleotide sequences for the cloning of the SHOX, SOX5 and SOX6 constructs

Constructs	Restriction enzyme sites	Sense oligonucleotide 5'–3'	Antisense oligonucleotide 5'–3'
pEG202:SHOX	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	TTAggatccCAGCCATGGAAGAGCTCACG	GTAaagcttGCGAGCCCCAGGGCCTCCGCGTGCT
pACT2:SHOX	<i>Nco</i> I/ <i>Bam</i> HI	ccatggCGATGGAAGAGCTCACGGCT	ATggatccTCAGAGCCCCAGGGCCTC
pACT2:SHOX(117–292)	<i>Nco</i> I/ <i>Bam</i> HI	CGccatggATCAGAGGCGCAGCCGCA	ATggatccTCAGAGCCCCAGGGCCTC
pACT2:SHOX(178–292)	<i>Nco</i> I/ <i>Bam</i> HI	CGccatggATCAGATGCATAAAGGCG	ATggatccTCAGAGCCCCAGGGCCTC
pcDNA3-HA:SHOX	<i>Xba</i> I/ <i>Apa</i> I	GCtctagaATGGAAGAGCTCACGGCT	ATgggcccTCAGAGCCCCAGGGCCTC
pcDNA3-FLAG:SHOX	<i>Xba</i> I/ <i>Apa</i> I	GCtctagaATGGAAGAGCTCACGGCT	ATgggcccTCAGAGCCCCAGGGCCTC
pGBT9:SOX6	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	CgaattcATGTCTTCCAAGCAAGCCACC	CgtcgacCTCAGTTGGCACTGACAGCC
pGBT9:SOX6(263–577)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	CgaattcATGCCTCCGCTCATGATCCCA	CgtcgacCGCTGCTGGCACGGCCGCGG
pGBT9:SOX6(263–787)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	CgaattcATGCCTCCGCTCATGATCCCA	CgtcgacCTCAGTTGGCACTGACAGCC
pGBT9:SOX6(479–797)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	CgaattcGGTGTGTGACGGGAAACTGTTC	CgtcgacCTCAGTTGGCACTGACAGCC
pcDNA3-HA:SOX6	<i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI	CtctagaATGTCTTCCAAGCAAGCCACC	CgaattcCTCAGTTGGCACTGACAGCC
pcDNA3-FLAG:SOX6	<i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI	CtctagaATGTCTTCCAAGCAAGCCACC	CgaattcCTCAGTTGGCACTGACAGCC
pGBT9:SOX5	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	CggatccGAATGTCTTCCAAGCGACCAGCC	CgtcgacTCAGTTGGCTTGTCTGCAATATGG
pcDNA3-HA:SOX5	<i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI	GCtctagaATGTCTTCCAAGCGACCAGCC	CgaattcTCAGTTGGCTTGTCTGCAATATGG
pcDNA3-HA:SOX9	<i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI	GtctagaATGAATCTCCTGGACCCCTTC	CgaattcTCAAGTCGAGTGAGCTGTG

The incorporated enzymes sites are indicated with lower case letters.

Table 2. Oligonucleotide sequences for the generation of the SHOX and SOX6 fragments and the SHOX missense mutants

Construct	Construct template	Mutation introduced	Sense oligonucleotide 5'–3'
pACT2:SHOX(1–211)	pACT2:SHOX	Q211X	CGGATGCCTTTCCAAtAGGTCCAGGCTCAG
pACT2:SHOX(117–211)	pACT2:SHOX(117–292)		
pcDNA3-HA:SHOX(Q211X)	pcDNA3-HA:SHOX		
pACT2:SHOX(1–115)	pACT2:SHOX	K115X	GACCAAGCTGtAACAGAGGGCGC
pACT2:SHOX(1–178)	pACT2:SHOX	Q178X	CGCAAACAAGAGAAAtAGATGCATAAAGGCGTC
pACT2:SHOX(117–178)	pACT2:SHOX(117–292)		
pACT2:SHOX(117–274)	pACT2:SHOX(117–292)	S274X	CAACAGCAAGAATTAgCAGCATCGCCG
pACT2:SHOX(K29T)	pACT2:SHOX	K29T	CGGCGGAGGTAcGAAGAGATTCCATTACG
pACT2:SHOX(K116E)	pACT2:SHOX	K116E	CAGACCAAGCTGgAACAGAGGGCGCAGC
pACT2:SHOX(L132V)	pACT2:SHOX	L132V	GCAGCTGAACGAGgTCGAGCGACTCTTC
pcDNA3-HA:SHOX(L132V)	pcDNA3-HA:SHOX		
pACT2:SHOX(R153L)	pACT2:SHOX	R153L	CGCGAGGAGCTCAGCCAGCtCCTGGGGCTCTCCGAGGC
pcDNA3-HA:SHOX(R153L)	pcDNA3-HA:SHOX		
pACT2:SHOX(R168W)	pACT2:SHOX	R168W	AGGTTTGGTTCCAGAAcTGAGAGCCAAGTGCC
pcDNA3-HA:SHOX(R168W)	pcDNA3-HA:SHOX		
pACT2:SHOX(A170P)	pACT2:SHOX	A170P	GGTTCAGAACCgGAGAcCCAAGTGCCGCAACAAG
pACT2:SHOX(R173C)	pACT2:SHOX	R173C	GAACCGGAGAGCCAAGTGcGCAAACAAGAGAATCAG
pACT2:SHOX(R195P)	pACT2:SHOX	R195P	GACGCTGCCCAGTGGCACCCTACGTC
pACT2:SHOX(A233E)	pACT2:SHOX	A233E	CACCCGCACCTGGaGGCGCACGCGCCC
pACT2:SHOX(D278A)	pACT2:SHOX	D278A	CCAGCATCGCCGcCTCGGGCTCAAGG
pGBT9:SOX6(1–444)	pGBT9:SOX6	S445X	CTATCTAGTCTCAACTAgCCTGCCCTTTTGGG
pGBT9:SOX6(1–577)	pGBT9:SOX6	E577X	GGCCGTGCCAGCAGCTAGCCACACATTAAGC

The mutated site is indicated with lower case letters.

~250 000 transformants for growth in synthetic dropout (SD) interacting media lacking leucine, uracyl and histidine amino acids (Clontech) and supplemented with 2 mM 3-aminotriazole (3AT, Sigma). The plates were incubated at 30°C for 3–5 days. Colonies (*n* = 51) were replated in duplicate onto SD media lacking leucine, uracyl, adenine and histidine (Clontech) and supplemented with 3.5 mM 3AT. Four of the 51 colonies picked showed no growth on this medium and were excluded from further analysis. β-Galactosidase assays on duplicates of these cotransformations excluded an additional four colonies as they were negative for this assay. Overnight cultures of the 43 remaining colonies were grown from the duplicate plate. The insert from the library plasmid was amplified by PCR. Single PCR products obtained for 36 of these samples were sequenced using oligonucleotides surrounding

the cloning site. In order to exclude the spurious activation of the system, the pGBDU:SHOX bait was transformed with PVP16 empty vector into PJ69-4A yeast cells, and cells were replated in duplicate onto SD interacting media (SD media lacking leucine and uracyl; SD media lacking leucine, uracyl and adenine; SD media lacking leucine, uracyl and histidine and supplemented with 3.5 mM 3AT). No autoactivation was detected.

Yeast two-hybrid cotransformation and β-galactosidase liquid assay

Cotransformations of the human *SHOX*, *SOX5* and *SOX6* constructs into *S. cerevisiae* strain Y187 were performed using the LiAc/ssDNA/PEG-heat shock protocol. Transformed cells

Table 3. Oligonucleotide sequences and dHPLC conditions for the mutation screening of the coding exons and intron/exon boundaries of *SOX5*

SOX5 exon	Oligonucleotide sequence Sense (5'–3')	Antisense (5'–3')	Temp. ann. (°C)	Size (bp)	dHPLC gradient (% buffer B)	dHPLC temp. (°C)
1	CCCCTAACACACAATGACG	AGTCTTGAAAAATACAAAAGAAACG	56	516	58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8	57.0 58.0 60.0 53.5
2	TCACCTTTTAATCTTTCAGCTGAAT	AGAGGTGAGGGCAGAAATAC	54	520	58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8 58.8–67.8	55.0 59.0 55.2 56.4
3	TTTTTGATGAAGCCATTATG	AGAGGTGAGGGCAGAAATAC	52	599	55.0–64.0 55.0–64.0	56.4 54.6
4	TGTACTATCTATTGTGCCAGAGAGC	GGGAGGTGGAAGGGACTCTTAT	54	509	58.7–67.7 58.7–67.7 58.7–67.7	54.6 58.1 59.9
5	TTAGGAGCACAGACACGTCTAT	AGCATAAGATGAAAATAACTGTTAG	52	435	57.6–66.6 57.6–66.6 57.6–66.6	53.5 55.5 56.9
6	AGTCCCAAAGCATATCCTCAAGC	ATTGAATTATAAAGAATATTGGC	53	491	58.5–67.5 58.5–67.5 58.5–67.5	55.6 58.0 60.0
7	TAATTTCAGGTGGAGAGTAGATAA	GGCTAAAAATTAAGAGAATCAACA	55	323	55.4–64.4 55.4–64.4 55.4–64.4	55.6 57.5 59.0
8	ATAGGAAAAATACCATATCTGAATA	CCCTTACTTGATTCTTACCTC	54	381	56.7–65.7 56.7–65.7 56.7–65.7	55.4 59.4 60.4
9	TTGAAGGAGGCATTATGTTGACAGC	GAATTCAAGCCGTGTATAGAGTG	56	458	58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0	56.5 57.5 59.5
10	AAAGTGATTTTATGGTTAAACGCT	GATGAGGCCTTCTATATTAATGG	53	370	56.5–65.5 56.5–65.5 56.5–65.5	53.6 55.8 59.0
11	GGAGTTAATGTATTATAATGTGGC	AGTTTTAATTGGCACTACCTAGA	51	269	53.7–62.7 53.7–62.7 53.7–62.7	53.8 55.0 56.5
12	TTTAACGCTAACACGAAGTG	AATGATCAGTAGCAATATCTAGTGG	54	539	59.0–68.0 59.0–68.0 59.0–68.0	54.9 56.9 57.9
13	TAGATTTTCTTGTCTCAGCCATA	TTTTTCAAGATCATGTGGGAGACTA	55	459	58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0	55.5 57.5 61.0
14	GAGTTTGAAAAATGTTAGGCA	GGCCACTGGTAAGGATG	56	514	58.7–67.7 58.7–67.7 58.7–67.7	55.0 57.5 61.5

were grown on SD plates lacking tryptophan and leucine (Clontech) at 30°C for 3–5 days. For interaction studies, β -galactosidase liquid assays using chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CRPG, Sigma-Aldrich) as substrate were performed according to the Matchmaker Yeast Protocol Handbook (Clontech).

Coimmunoprecipitation

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). Twenty-four hours before transfection, cells were seeded in a 10 cm plate at a density of 3×10^6 cells. Medium was changed prior to transfection. Cells were then cotransfected with 10 μ g of each plasmid using FUGENE6 transfection reagent (Roche) at a FUGENE6:DNA ratio of 2.5:2. Twenty-four hours post-transfection, cells were lysed using the reagents from the Nuclear Complex co-IP kit (Active Motif)

and following the manufacturer's instructions. Nuclear extracts were immunoprecipitated with 20 μ l of anti-FLAG M2-agarose beads (Sigma-Aldrich) using reagents of the Nuclear Complex co-IP kit (Active Motif) and following the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Proteins from cell extracts and immunoprecipitation samples were separated by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (BioRad). Membranes were blocked overnight at 4°C in TN buffer (Tris 50 mM, pH = 8, NaCl 150 mM, Sigma-Aldrich) with 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich), 5% non-fat dry milk and 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Blots were then incubated for 2 h at room temperature with various antibodies: rabbit polyclonal anti-SHOX (20) at a dilution of 1:3000, rabbit polyclonal anti-SOX5 (Ab26041, Abcam) at a dilution of 1:2000, rabbit polyclonal anti-SOX6

Table 4. Oligonucleotide sequences and dHPLC conditions for the mutation screening of the coding exons and intron/exon boundaries of *SOX6*

<i>SOX6</i> exon	Oligonucleotide sequence Sense (5'–3')	Antisense (5'–3')	Temp. ann. (°C)	Size (bp)	dHPLC gradient (% buffer B)	dHPLC temp. (°C)
2	GGACCACAAATATCTCTAAAGT	CTGGTAGTTGTTTCATGATCT	53	490	58.4–67.4 58.4–67.4 58.4–67.4	56.0 59.0 59.8
3	CTAAGCATCATATACTGTCTC	GCCATCACCATAGTAACCTC	53	458	58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0	54.0 56.0 60.0
4	TATCCTGGGGTTCAAGCTACA	GTGGGGAAATTTTTCAGTTTGT	52	412	57.3–66.3 57.3–66.3 57.3–66.3	52.1 53.5 54.5
5	TACTCTCTGGTGTCTGTACC	CTTACAACAAATAAGCCAATCA	56	418	57.4–66.4 57.4–66.4 57.4–66.4	55.7 60.7 60.7
6	GAGGTAATGGCAGAGGTGTAAG	TTTATAAGACAGGGGTACATC	51	226	57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1	55.5 56.4 61.0
7	TCTGATCATAGGCTCTCTTCTG	CATAGTTCCTGGCATGCTCC	55	251	53.0–62.0 53.0–62.0 53.0–62.0	61.5 63.0 63.0
8	TTTGGGCTTAGAGCAATGTTG	AGTCCTAATGTGATCTTTTCC	53	403	57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1	54.8 57.3 58.8
9	CAGTGCCACTGTTTGATACTGT	GAAGAGCCTCCTTAGGAATG	53	456	55.9–64.9 55.9–64.9 55.9–64.9	58.1 59.1 59.1
10	GGCTGTCTGAGAAATCTAACAA	CCTGTTTCTCAATGCTCAATTA	55	416	57.3–63.3 57.3–63.3 57.3–63.3	57.0 58.5 61.0
11	GTAGGAGAATGTGGCATTGT	CTTTTACTAAGGAGCACTTTGG	55	402	57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1	54.7 56.7 60.7
12	CTACAGGGGAGGGGATAGTAGT	GGGCGTATTTGTTAATCAAC	56	456	58.0–67.0 58.0–67.0 58.0–67.0	57.0 59.1 60.5
13	CAAACAGCTTTCAACGGAATCT	CATTTCTTTGCTTTGCCTAA	55	404	57.1–66.1 57.1–66.1 57.1–66.1	54.7 56.1 56.8
14	CGGCAAGCTGTGTGACATTAT	AGCTGGCTGACCTTCGTCTAAC	59	444	57.8–66.8 57.8–66.8 57.8–66.8	57.9 60.1 60.1
15	AATATGTTGCCTTGACCACTTG	CTATGACACAGCAAAGATTCTC	55	420	57.4–66.4 57.4–66.4 57.4–66.4	58.2 58.7 59.0
16	GGGCTCCCTTTTGAAAGTG TAG	CATGCGGGCTCTTAATAACTC	57	484	58.4–67.4 58.4–67.4 58.4–67.4	55.5 57.5 59.0

(Sc-20092, Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:2000, rabbit polyclonal anti-SOX9 (Ab3697, Abcam) at a dilution of 1:2000, mouse monoclonal anti-FLAG antibody (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:3000 and mouse monoclonal anti-HA antibody (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:2000. After washing, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody or with horseradish peroxidase-conjugated secondary rabbit anti-mouse antibody (Pierce). Finally, proteins were visualized with the Western lightning chemiluminescence reagent plus (Perkin Elmer).

Immunohistochemistry

Human tibia growth plate sections were obtained from two spontaneously aborted normal fetuses of 18 and 32 weeks, after obtaining informed consent. Paraffin sections of growth plates were deparaffinized and rehydrated to water. Exogenous

peroxidase was quenched with 0.3% H₂O₂ in methanol, and the non-specific antibody-binding sites were blocked using 10% normal goat serum (Vector Laboratories). The sections were incubated at 4°C overnight with the antibodies, described previously, at the following dilutions: SHOX (1:50), SOX5 (1:50), SOX6 (1:25) and SOX9 (1:50). The biotin/avidin–horseradish peroxidase system (ABC Universal kit, Vector Laboratories) was used to detect antibody binding, and diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories) was used to visualize the results. Cells were then stained with haematoxylin (Sigma-Aldrich) for 2 min and finally mounted with Depex (BDH). Negative controls were performed by (i) replacing the primary antibody with phosphate-buffered saline, (ii) using a rabbit polyclonal IgG isotype control (Ab27472, Abcam) at a dilution of 1:50 or (iii) using preimmune serum from the rabbit immunized with the SHOX peptide, at a dilution of 1:1000. Sections of a normal adult colon were also used as negative control tissue with the SHOX, SOX5,

Table 5. SOX6 self-designed MLPA

Probe	Chromosome location	SOX6 exon	Length (bp)	Sequence at ligation site
SOX6- 2	11p15.3	Exon 2	94	CAAGATGCTGACTGGGACAGCGTTCT-GTCATCTCAGCAAAGAATGGTGAGCC
SOX6- 3	11p15.3	Exon 3	104	CAAAGGGAGTCTTGCCGATGTGGT-GGACACACTGAAACAGAAGAAGCTTGAGG
SOX6- 5	11p15.3	Exon 5	108	GAACGGCAGCTCTCCACCATGATT-ACCCAGCTGATCAGTTTACGGGAG
SOX6- 7	11p15.3	Exon 7	117	GCTCCCTGTCTGATCATAGGCTCTTT-CTGTTAGCAGGTTACGGGTACATG
SOX6- 8	11p15.3	Exon 8	122	CCGACAGGTGATAACTACCCGTA-CAGTTCATTCCATCAACAATGGCAGCTGC
SOX6- 9	11p15.3	Exon 9	133	GGCTAAAGGGCCTAAGTGACCGTTT-TGGCAGGAATTTGGACACCTTTGAAC
SOX6- 10	11p15.3	Exon 10	143	GTCACCTGGAGCAAAGATGCCATC-AACTCCACAGCCACCAACACAGCAG
SOX6- 11	11p15.3	Exon 11	138	CAGAACCTCTTCCAGCCAGCAAA-ACCAGCCCTGTCAATCTGCCAAACT
SOX6- 13	11p15.3	Exon 13	148	GACCTTACTCGGCCAGAAGATGCA-GAGGGTGAGTGGCTTTTCTCTAGTTC
SOX6- 15	11p15.3	Exon 15	100	CTGATGAGGTCTCGGAGACAGGAGAT-GAGGCAGTTCTTTACTGTGGGGTAAGTATTCC
SOX6- 16	11p15.3	Exon 16	152	CGGTCATCCAGACACTTATGGTA-TGAAGACAGATGGCGGAAGCCTAG
WBSR1	7q11.23	—	89	GGTAGCTCTCGAGAATCTAGAGGTGG-ATGGGATTTCCCGGGATGACTTC
RAI1	17p11.2	—	112	GGCAAGGAAAAGTGGCCTTTTTCGTGACA-CAGAAGTGGACACATCATTCTGATCTCA GGGCTCT
MAPT	17q21.31	—	128	CTGGGACTTTAGGGCTAACCAGTTCTCTTTGTA-AGGACTTGTGCCTCTTGGGAGACG TCCACCCGTTTC

Chromosomal location, *SOX6* exons, probe lengths and ligation site sequences are indicated for the *SOX6* and three control fragments.

SOX6 and *SOX9* antibodies. Sections were examined using a BX41 microscope (Olympus), and photos were taken using a DP20 digital camera (Olympus) with Cella software (Olympus).

Luciferase assay

U2OS cells were seeded in 12-well plates at a density of 160 000 cells/well. Reporter constructs were cotransfected with expression plasmids using FUGENE6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions and with a 3:2 FUGENE:DNA ratio. DNA included 300 ng of PRL-TK control plasmid, 1500 ng of (4XA1)pCol2Luc reporter plasmid (control and reporter plasmids were transfected in a 1:5 ratio) and 250 ng of *SHOX*, *SOX5*, *SOX6* or *SOX9* expression plasmids (pcDNA3-FLAG or pcDNA3-HA vectors). Empty expression plasmid was added, whenever necessary, to normalize DNA concentrations. Each plasmid combination was transfected in three wells. Twenty-four hours later, cells were lysed and the reporter activity was measured in triplicate using the Dual luciferase reporter assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Each sample was normalized, first, with respect to the renilla luciferase activity, and then secondly, to that transfected only with the reporter plasmid. Statistical analyses were undertaken with SPSS v15.0 for Windows. We employed one-factor analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni *post hoc* test for analysing the results of luciferase assay.

SOX5 and SOX6 mutation screening

Patients. Ethical approval was obtained from the respective institutions. The cohort consisted of 37 probands with LWD or suspected LWD. All participants provided informed consent for the performed studies. Clinical details were obtained for all patients recruited into the study. Whenever possible, these included birth details, anthropometric measurement, actual height and height standard deviation scores (SDSs) according to the national standards (30), physical

examination of extremities and X-rays of the lower arm. Family histories were also documented, including parental heights. In all cases, the presence of *SHOX*/*PAR1* alterations had been excluded previously (5,9).

Peripheral blood was drawn from probands for DNA extraction. Genomic DNA was isolated by the salt precipitation method (31). The screening of point mutations, small deletions and insertions in the coding sequences and intron/exon boundaries of *SOX5* (ENST00000451604) and *SOX6* (ENST00000316399) was performed by denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC, Transgenomic Wave 3500HT), and subsequent sequencing of any identified heteroduplex using the BigDye Terminator V3.1 kit (Applied Biosystems). PCR conditions were as described previously (5). Primer sequences, amplicon sizes, PCR annealing temperatures and dHPLC conditions for *SOX5* and *SOX6* are available in Tables 3 and 4, respectively.

SOX5 deletion analysis was undertaken through the detection of heterozygosity of a (GA)_n dinucleotide repeat marker located ~53 kb upstream of *SOX5* exon 1 and by the detection of heterozygosity of SNPs in the *SOX5* amplicons. Analysis of the patients for the *SOX5* microsatellite marker was undertaken using the following oligonucleotides: 5'-CCGCTGCTGGAAGTG-3' and 5'-CCACCTATGATCGTCTCCAA-3'. PCR conditions were as previously described (5) and the amplicon annealing temperature was 55°C. Amplification products were separated using an ABI 3130 Sequencer.

SOX6 large deletions and duplications were studied in our cohort by observing heterozygosity of SNPs in the *SOX6* amplicons and by using a *SOX6* self-designed MLPA assay. This consisted of 11 *SOX6* probes and three control fragments (Table 5). MLPA reactions were carried out using an EK1 SALSA MLPA Kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's protocol. The ratios of the test's peak areas versus those of the control samples were determined using an Excel data sheet. Normal peaks were classified as showing a ratio of 0.65–1.35, whereas deletions and duplications were classified as having a ratio <0.65 or >1.35, respectively.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the clinicians and patients who participated in the study; Dr Santiago Rodríguez de Córdoba and Dr Olga Criado-García for their help; Dr Stan Hollenberg for the pGBDU vector and the mouse cDNA library; Dr Shiro Ikewaga and Dr Toshiyuki Ikeda for the *SOX5* and *SOX6* cDNA clones, respectively; Dr Veronique Lefebvre for the (4XA1)pCol2Luc plasmid; Dr Victor Ruiz for providing the mouse growth plate samples; Dr Pascual Sanz for critical reading; and Francisca Diaz-González for technical assistance.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by the Ministerio de Innovación y Ciencia (MICINN SAF2003-02511, SAF2006-00663 to M.A.-C., S.B.-S., J.A., Á.C.-B., K.E.H.; SAF2009-08230 to V.B.-T., A.B., S.B.-S., K.E.H.). PhD studentships were awarded from the Comunidad de Madrid to M.A.-C.; CIBERER to P.Y.-C. and A.B.; MICINN (SAF2009-00663 to V.B.-T., A.B.); Research Training Fellowship from the Wellcome Trust (051419/055 to D.J.S.); and postdoctoral fellowship from CIBERER to S.B.-S.

REFERENCES

- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelman, M. *et al.* (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.*, **16**, 54–63.
- Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Gehron Robey, P., Laig-Webster, M. and Chiong, W. (1997) PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1341–1347.
- Belin, V., Cusin, V., Viot, G., Girlich, D., Toutain, A., Moncla, A., Vekemans, M., Le Merrer, M., Munnich, A. and Cormier-Daire, V. (1998) SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat. Genet.*, **19**, 67–69.
- Shears, D.J., Vassal, H.J., Goodman, F.R., Palmer, R.W., Reardon, W., Superti-Furga, A., Scambler, P.J. and Winter, R.M. (1998) Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat. Genet.*, **19**, 70–73.
- Benito-Sanz, S., Thomas, N.S., Huber, C., Gorbenco del Blanco, D., Aza-Carmona, M., Crolla, J.A., Maloney, V., Rappold, G., Argente, J., Campos-Barros, A. *et al.* (2005) A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am. J. Hum. Genet.*, **77**, 533–544.
- Sabherwal, N., Bangs, F., Röth, R., Weiss, B., Jantz, K., Tiecke, E., Hinkel, G.K., Spaich, C., Hauffa, B.P., van der Kamp, H. *et al.* (2007) Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 210–222.
- Campos-Barros, A., Benito-Sanz, S., Ross, J.L., Zinn, A.R. and Heath, K.E. (2007) Compound heterozygosity of SHOX-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Am. J. Med. Genet. A*, **143**, 933–938.
- Bertorelli, R., Capone, L., Ambrosetti, F., Garavelli, L., Variale, L., Mazza, V., Stanghellini, I., Percesepe, A. and Forabosco, A. (2007) The homozygous deletion of the 3' enhancer of the SHOX gene causes Langer mesomelic dysplasia. *Clin. Genet.*, **72**, 490–491.
- Benito-Sanz, S., del Blanco, D.G., Aza-Carmona, M., Magano, L.F., Lapunzina, P., Argente, J., Campos-Barros, A. and Heath, K.E. (2006) PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum. Mutat.*, **27**, 1062.
- Huber, C., Rosilio, M., Munnich, A. and Cormier-Daire, V., French SHOX GeNeSiS Module. (2006) High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J. Med. Genet.*, **43**, 735–739.
- Chen, J., Wildhardt, G., Zhong, Z., Roeth, R., Weiss, B., Steinberger, D., Decker, J., Blum, W.F. and Rappold, G.A. (2009) Enhancer mutations of the SHOX gene as a frequent cause of short stature—the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J. Med. Genet.*, **46**, 834–839.
- Cohen, P., Rogol, A.D., Deal, C.L., Saenger, P., Reiter, E.O., Ross, J.L., Chernausek, S.D., Savage, M.O. and Wit, J.M. 2007 ISS Consensus Workshop Participants. (2008) Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 4210–4217.
- Marchini, A., Häcker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M. and Rappold, G. (2007) BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 3081–3087.
- Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T. *et al.* (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 695–702.
- Tiecke, E., Bangs, F., Blaschke, R., Farrell, E.R., Rappold, G. and Tickle, C. (2006) Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev. Biol.*, **298**, 585–596.
- Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R.J., Häcker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J.M. *et al.* (2004) The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, **279**, 37103–37114.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S. and Chung, U.I. (2004) The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.*, **50**, 3561–3573.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B. and Lefebvre, V. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell.*, **1**, 277–290.
- Smits, P., Dy, P., Mitra, S. and Lefebvre, V. (2004) Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J. Cell Biol.*, **164**, 747–758.
- Rao, E., Blaschke, R.J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M. and Rappold, G.A. (2001) The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 3083–3091.
- Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A. and de Crombrughe, B. (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.*, **16**, 2813–2828.
- Han, Y. and Lefebvre, V. (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 4999–5013.
- Wissmüller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M. and Wegner, M. (2006) The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1735–1744.
- Lefebvre, V. (2002) Towards understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J. Bone Miner. Metab.*, **20**, 21–30.
- Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B. (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.*, **17**, 5718–5733.
- Liu, C.J., Zhang, Y., Xu, K., Parsons, D., Alfonso, D. and Di Cesare, P.E. (2007) Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by

- Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. *Front. Biosci.*, **12**, 3899–3910.
27. Schneider, K.U., Marchini, A., Sabherwal, N., Röth, R., Niesler, B., Marttila, T., Blaschke, R.J., Lawson, M., Domic, M. and Rappold, G. (2005) Alteration of DNA binding, dimerization, and nuclear translocation of SHOX homeodomain mutations identified in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *Hum. Mutat.*, **26**, 44–52.
 28. Saito, T., Ikeda, T., Nakamura, K., Chung, U.I. and Kawaguchi, H. (2007) S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep.*, **8**, 504–509.
 29. Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Arlt, M.F., Horton, J.P. and Brilliant, M.H. (2001) Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene. *Gene*, **7**, 157–164.
 30. Sobradillo, B., Aguirre, A., Aresti, U., Bilbao, A., Fernández-Ramos, C., Lizárraga, A., Lorenzo, H., Madariaga, L., Rica, I., Ruiz, I. *et al.* (2002) Curvas y Tablas de crecimiento (Estudios Longitudinal y Transversal). *Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre Bilbao*, 1–36, www.aepap.org/crecorbegozo.htm.
 31. Nicolaidis, N.C. and Stoeckert, C.J. Jr. (1990) A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells. *Biotechniques*, **8**, 154–156.

Clinical and Molecular Evaluation of *SHOX*/PAR1 Duplications in Léri-Weill Dyschondrosteosis (LWD) and Idiopathic Short Stature (ISS)

S. Benito-Sanz, E. Barroso, D. Heine-Suñer, A. Hisado-Oliva, V. Romanelli, J. Rosell, A. Aragones, M. Caimari, J. Argente, J. L. Ross, A. R. Zinn, R. Gracia, P. Lapunzina, A. Campos-Barros, and K. E. Heath

Institute of Medical and Molecular Genetics (S.B.-S., E.B., A.H.-O., V.R., P.L., A.C.-B., K.E.H.), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, 28046 Madrid, Spain; Department of Genetics (D.H.-S., J.R.) and Pediatric Endocrinology Unit (M.C.), Department of Pediatrics, Hospital Universitario Son Dureta, 07014 Palma de Mallorca, Spain; Department of Pediatrics (A.A.), Hospital Virgen de la Salud, 45004 Toledo, Spain; Department of Endocrinology (J.A.), Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación La Princesa and Department of Pediatrics, Universidad Autónoma de Madrid, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología, Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, 28009 Madrid, Spain; Department of Pediatric Endocrinology (R.G.), Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain; Department of Pediatrics (J.L.R.), Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107; and Dermott Center for Human Growth and Development and Department of Internal Medicine (A.R.Z.), University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, Texas 75235

Context: Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) is a skeletal dysplasia characterized by disproportionate short stature and the Madelung deformity of the forearm. *SHOX* mutations and pseudoautosomal region 1 deletions encompassing *SHOX* or its enhancers have been identified in approximately 60% of LWD and approximately 15% of idiopathic short stature (ISS) individuals. Recently *SHOX* duplications have been described in LWD/ISS but also in individuals with other clinical manifestations, thus questioning their pathogenicity.

Objective: The objective of the study was to investigate the pathogenicity of *SHOX* duplications in LWD and ISS.

Design and Methods: Multiplex ligation-dependent probe amplification is routinely used in our unit to analyze for *SHOX*/pseudoautosomal region 1 copy number changes in LWD/ISS referrals. Quantitative PCR, microsatellite marker, and fluorescence *in situ* hybridization analysis were undertaken to confirm all identified duplications.

Results: During the routine analysis of 122 LWD and 613 ISS referrals, a total of four complete and 10 partial *SHOX* duplications or multiple copy number ($n > 3$) as well as one duplication of the *SHOX* 5' flanking region were identified in nine LWD and six ISS cases. Partial *SHOX* duplications appeared to have a more deleterious effect on skeletal dysplasia and height gain than complete *SHOX* duplications. Importantly, no increase in *SHOX* copy number was identified in 340 individuals with normal stature or 104 overgrowth referrals.

Conclusion: MLPA analysis of *SHOX*/PAR1 led to the identification of partial and complete *SHOX* duplications or multiple copies associated with LWD or ISS, suggesting that they may represent an additional class of mutations implicated in the molecular etiology of these clinical entities. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: E404–E412, 2011)

Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) [Mendelian Inheritance in Man (MIM) 127300] is a dominantly inherited skeletal dysplasia characterized by disproportionate short stature, mesomelic limb shortening, and the Madelung deformity of the forearm: the bowing of the radius and the distal dislocation of the ulna (1, 2). Idiopathic short stature (ISS; MIM 300582) is a condition defined as a height below -2 SD score (SDS) in the absence of known specific causative disorders (3). To date, heterozygous deletions of two distinct regions of the pseudoautosomal region 1 (PAR1), the short-stature homeobox-containing gene (*SHOX*; MIM 313865) (4, 5) and the downstream enhancer region (6–8) or point and small insertions or deletions (indel) mutations within *SHOX*, have been identified in up to 60% of LWD and approximately 15% ISS patients (9–11). Homozygous or compound heterozygous *SHOX* mutations as well as biallelic deletions of *SHOX* and/or the downstream PAR1 region result in a more severe phenotype, known as Langer mesomelic dysplasia (MIM 249700) (12–15). Conversely, *SHOX* overdosage, caused by either structural rearrangements or numerical abnormalities of the sex chromosomes, has been shown to be associated with normal to tall stature (16–18). Although the underlying pathological mechanism remains unknown, it has been proposed that the association of an extra copy of *SHOX*, especially with estrogen deficiency, results in tall stature through an abnormally prolonged growth period in the late teenage years and early adulthood (17). In contrast, *SHOX* duplications have been recently described in three LWD/ISS patients as well as in individuals with diverse clinical features, leading to uncertainty of their involvement in LWD/ISS etiology (19–22).

Until recently, the molecular diagnosis of LWD, Langer mesomelic dysplasia, and ISS patients was commonly undertaken by microsatellite and/or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of the *SHOX* encompassing PAR1 sequence (9, 10, 23). We and others (6, 9, 24–27) have shown the advantages of using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for the identification of PAR1 deletions encompassing *SHOX* and/or the downstream enhancer region. This technique has permitted us now to identify 14 complete or partial *SHOX* duplications or multiple copies ($n > 3$) and one duplication upstream of *SHOX* in nine LWD and six ISS probands. We report our clinical and molecular findings on the largest number of *SHOX* duplications reported to date, with the aim to increase our knowledge of whether such alterations are involved in the etiology of LWD and ISS.

Patients and Methods

Clinical patients

The study was approved by the local ethical committees and all participants provided informed consent. The LWD and ISS patient samples were referred from endocrinology and genetic clinics. LWD patients were ascertained using the inclusion criteria of the presence of the Madelung deformity and mesomelic shortening of the limbs in the proband or a direct family member. Stature was recorded and SDS were determined according to the population standards for age and gender (28) (<http://www.aepap.org/crcorbegoza.ht>; <http://www.magicfoundation.org/>). ISS patients with stature less than -2 SDS were ascertained using the current consensus criteria (3).

Two control cohorts were also obtained and analyzed. A cohort of 340 normal controls, obtained from the Spanish DNA bank (University of Salamanca, Salamanca, Spain), with heights within the normal range for the Spanish population for age and gender ($-2 < \text{SDS} < +2$). The second control cohort consisted of 104 overgrowth referrals with heights greater than 3 SDS.

Peripheral blood was drawn from probands and, when possible, from relevant family members. All samples were reported to have a normal G-banding karyotype. Genomic DNA was isolated from whole blood using the salt precipitation method (blood kit; QIAGEN, Valencia, CA).

MLPA assay

MLPA analysis was carried out using the commercial *SHOX*/PAR1 MLPA kit (Salsas P018B-D1; MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) in accordance to the manufacturer's recommendations. In particular cases, *SHOX* duplications were further delimited using an additional MLPA assay including six novel probes, located between the Xp telomere and *SHOX* (kindly donated by Dr. Simon Thomas, Wessex Regional Genetics Service, Wiltshire, UK). The MLPA assays were analyzed with help of GeneMapper software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Subsequently the ratios of the proband's peak areas *vs.* controls' samples were determined using an Excel data sheet (Microsoft Corp., Richmond, CA). Normal peaks were classified as showing a ratio of 0.65–1.35, whereas deletions and duplications were classified as having a ratio less than 0.65 or greater than 1.35, respectively. Each alteration was confirmed in an independent MLPA replicate.

Validation of *SHOX* copy number

Microsatellite analysis

Samples were analyzed for the presence of a triallelic pattern with the help of a panel of previously described PAR1 microsatellite markers: DXYS10137, DXYS10138, DXYS201, DXYS10092, DXYS290, DXYS10093, and DXYS10083 (6, 24).

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Three qPCR assays targeting sequences within *SHOX* and flanking regions were designed to confirm the *SHOX* copy number. Primer sequences and probes are described in Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>. The qPCR was performed in a final volume of 10 μ l. The reactions, in duplicate, contained 1 \times LightCycler 480 probes master mix (Roche, Mannheim, Germany), 10 μ M of each primer, 10 μ M of both

TABLE 1. Clinical features of the 15 LWD/ISS probands with complete or partial *SHOX* or *SHOX* 5' flanking duplications or multiple copies

Proband	Gender	LWD/ISS	Duplication type (extents)	Height SDS (adult or age in years)	MD (Y/N)	Other clinical characteristics
1	F	ISS	Complete	−2.57 (13.0)	N	Slightly shortened neck
2	F	ISS	Complete	−2.19 (adult)	N	
3	F	ISS	Complete	−2.29 (13.8)	N	Postponderal delay, dermatitis atopica
4	F	LWD	Complete	0.30 (adult)	Y	Shortening of the ulnas, cubitus valgus, articular enlarging of hands, articular pain in wrists, hips, and knees
5	F	ISS	Partial (5'-Ex3)	−2.01 (6.7)	N	
6	M	LWD	Partial (5'-Ex3)	−2.25 (13.0)	Y	
7	M	LWD	Partial (Ex2-6b)	−1.80 (10.7)	Y	
8	M	LWD	Partial (Ex2-6a)	−3.88 (15.5)	Y	
9	F	LWD	Partial (Ex2-6a)	−4.13 (5.0)	Y	Piloric stenosis, vesicle urethral reflux
10	F	LWD	Partial (Ex2-6a)	−2.24 (13.0)	Y	Minimal cubitus valgus
11	M	LWD	Partial (Ex2-6a)	−2.06 (10.0)	Y	
12	F	LWD	Partial (Ex2-6a)	−3.95 (13.5)	Y	Menarche at 8 yr
13	F	LWD	Partial (Ex2-6a)	−1.88 (7.5)	N	Small for gestational age, premature adrenarche
14	F	ISS	Partial (Ex4-3')	−2.40 (14.0)	N	Mental retardation, dysmorphic facies
15	F	ISS	5' region	−2.10 (adult)	N	

F, Female; M, male; MD, Madelung deformity present (Y) or absent (N).

target (labeled with FAM) and calibrator [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), labeled with HEX] probes, and 10 ng of genomic DNA. The cycling conditions were as follows: a prerun at 95 C for 10 min, 45 cycles of 10 sec at 95 C, 30 sec at 60 C and 1 sec at 72 C, and finally a 40 C cooling step for 30 sec. A no-template negative control was included in each assay. The samples were amplified in a Lightcycler 480 system (Roche). Test samples and normal controls were first normalized to the GAPDH control and subsequently to the mean Ct value determined for five normal controls. Normal peaks were classified as showing a ratio of 0.65–1.35, whereas duplications were classified as having a ratio greater than 1.35.

FISH analysis

To determine if the detected extra copy or copies were the consequence of chromosomal translocations, we undertook FISH analysis on metaphase chromosomes prepared from peripheral blood lymphocytes by standard techniques (29). FISH was performed with cosmids from the distal PAR1, including two spanning the entire *SHOX*, LLNOYCO3'M'15D10 and LLNOYCO3'M'34F5 (30). Centromeric probes DXZ2 and DYZ3 were used as controls.

Exclusion of point mutations, small deletions, or insertions in *SHOX*

All LWD and ISS probands were excluded for *SHOX* mutations by denaturing HPLC, high resolution melting analysis, and/or DNA sequencing, as previously reported (9).

Results

Characterization of *SHOX* duplications

Four complete and 10 partial *SHOX* duplications or multiple copies ($n > 3$) as well as one duplication of the *SHOX* 5' flanking region were identified in nine LWD and six ISS probands (Table 1 and Fig. 1). Eight of nine LWD probands presented with partial *SHOX* duplications or multiple copies; one LWD proband had a complete *SHOX* duplication, whereas three of six ISS referrals presented with whole *SHOX* duplications; two presented with two different partial *SHOX* duplications, and one ISS proband presented with a duplication of the *SHOX* 5' flanking region (Fig. 2). No pathogenic PAR1 deletions or point or indel *SHOX* mutations were identified in the 15 probands. Proband heights and clinical details are shown in Fig. 1 and Table 1. No increases in *SHOX* copy number were detected in 340 normal height controls or 104 overgrowth referrals.

The complete *SHOX* duplications ranged in size from 38 to 346 kb, extending from the *SHOX* 5' flanking region through at least exon 6b in three ISS cases, and from the *SHOX* 5' flanking region through to approximately 100 kb downstream of *SHOX* in the single LWD case presenting with a complete gene duplication (Fig. 2). Partial *SHOX* duplications or multiple copies ranged from 13 to 294 kb, extending from the *SHOX* 5' flanking region

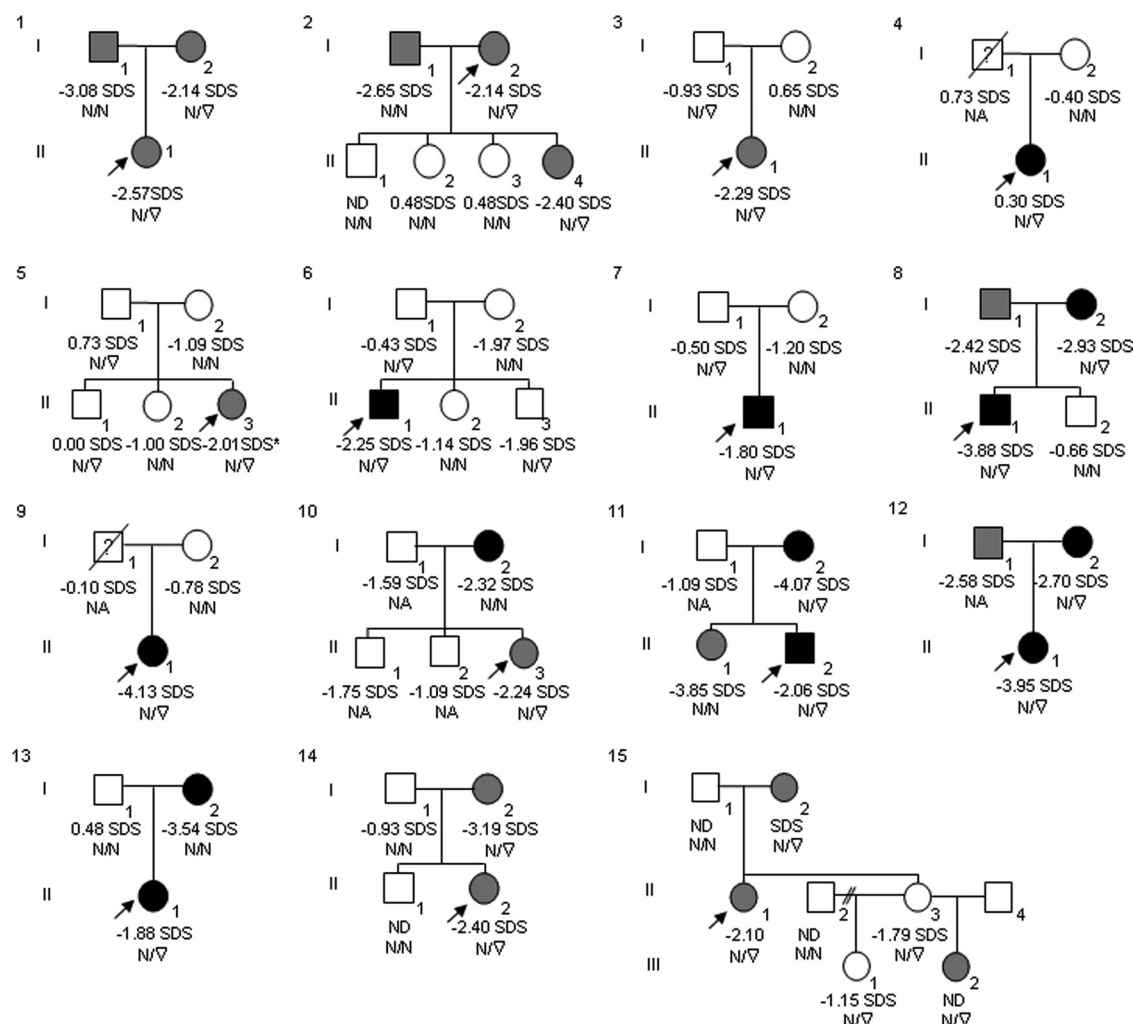


FIG. 1. Family pedigrees of the 15 LWD/ISS probands with duplications or multiple copy number of *SHOX* or the 5' flanking region. The probands are indicated by the arrow. Black-filled symbols indicate the clinical diagnosis of LWD, whereas gray-filled symbols indicate the clinical diagnosis of ISS, unfilled symbols indicate normal stature and no dysplasia. The height SDS and *SHOX* copy number are shown below each individual. ND, Height not documented. Copy number status is indicated with N (normal, $n = 2$) and inverted triangles (increased *SHOX* copy number, $n > 2$). NA, No DNA available but heights were obtained from spouse or by telephone. In 11 cases the alterations were shown to be inherited (probands 1–3, 5–8, 11, 12, 14, 15). Paternity was confirmed by specific testing in proband family 13. Somatic mosaicism is suspected in I.2 of family 13. The inheritance of the duplication could not be ascertained in the remaining three cases due to lack of parental DNA samples (probands 4, 9, and 10). In family 15, II.3 has an inversion of chromosome 14q22–q24, and III.1 has mental retardation and premature adrenarche.

through to exon 3, in two cases (one LWD and one ISS); from exon 2 to exon 6a in six LWD cases; from exon 2 through to exon 6b in one LWD case; and from exon 4 to approximately 150 kb downstream of *SHOX* in one ISS referral (Fig. 2). Proband 15 carried a duplication located upstream of *SHOX*, which did not include any *SHOX* coding sequence (Fig. 2). The duplication was at least 320 kb in size, extending from the most telomerically analyzed probe, P1 (~250 kb from telomere), to marker DYS201, 15 kb upstream of *SHOX*.

The height SDS of the eight LWD probands with partial *SHOX* duplications or multiple copies ranged between -4.13 and -1.80 , whereas the single LWD who had a complete *SHOX* duplication (proband 4) had a height within the normal range (0.3 SDS). She presented with shortening of the ulnas, Madelung deformity, curving of

the lower limbs, and cubitus valgus and complained of articular pain in the wrists, hips, and knees.

Six LWD referrals (probands 8–13) carried a similar duplication spanning *SHOX* exons 2–6a (Fig. 2). No *SHOX* haplotype was shared between these six probands. Interestingly, in one case (proband 8), both affected parents presented with a similar alteration as the LWD diagnosed proband (Fig. 1), although no common *SHOX* haplotype was shared between them (data not shown). PAR1 haplotype analysis confirmed that proband 8 had inherited the allele with the extra copies from his mother and shared the same nonduplicated paternal allele with his healthy brother, who had inherited the nonduplicated alleles from both parents. Probands 5 (ISS) and 6 (LWD) appear to share the same duplication extents, spanning from probe P2 in the *SHOX* 5' flanking region to exon 3,

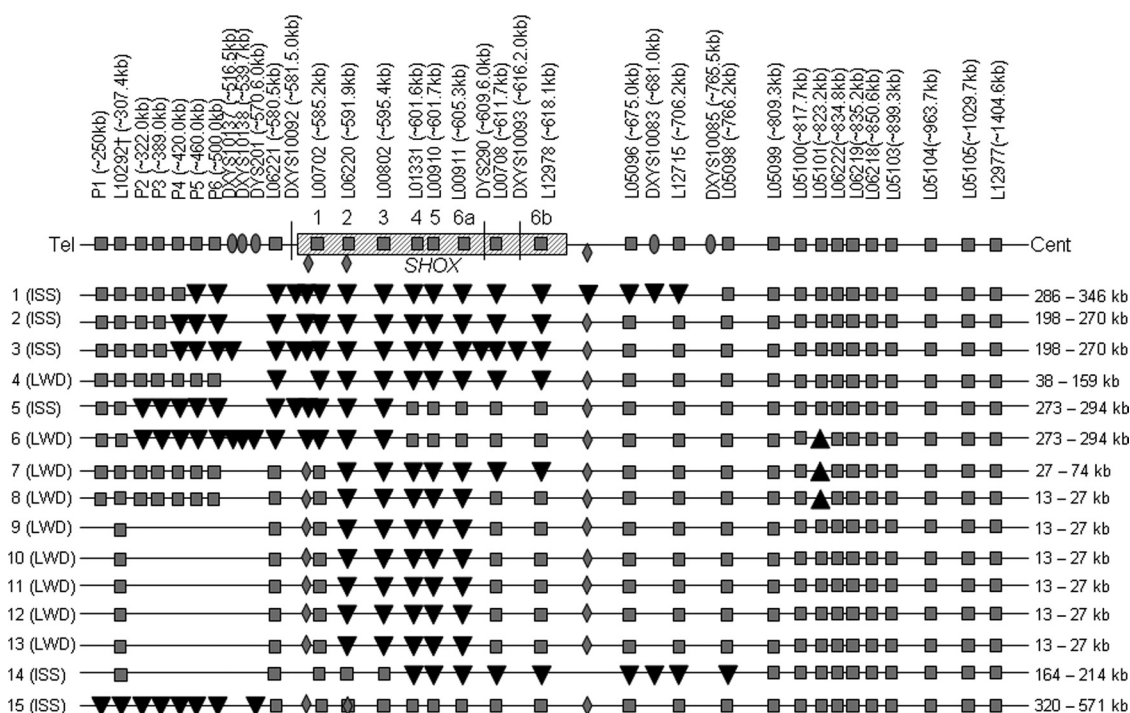


FIG. 2. Schematic representation of the genomic location and approximate extensions of the observed *SHOX* duplications in the 15 LWD/ISS probands, estimated from data obtained from MLPA, qPCR, and microsatellite marker analysis (diagram not drawn to scale). The approximate coordinates are according to chromosome X, National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD) assembly GRCh37. The MLPA probes are named according to kit P018D1 and are indicated by gray boxes, microsatellite markers are indicated by gray ovals, and qPCR amplicons are indicated by gray diamonds. ▼, An increased *SHOX* copy number ($n > 2$), determined by either MLPA or qPCR or by the observation of three alleles by microsatellite marker analysis. The duplication size range is indicated adjacent to each proband. ▲, The presence of a deletion in heterozygosity corresponding to MLPA probe L5101 observed in probands 6 and 8 and in homozygosity in proband 9. The deletion was characterized by fine-tiling Y-chromosome aCGH (Nimblegen Y chromosome specific array), and the breakpoint was subsequently characterized to have occurred between 820736 and 825695 on the X chromosome, National Center for Biotechnology Information assembly GRCh37/hg19. Part of the *AluY* sequence from the 3' deletion end of the 4959-bp deletion is present (61 bp), which aligned with the *AluSc* sequence from the 5' deletion end resulting in homologous recombination. The frequency of this 4959-bp deletion was not significantly different in ISS (11.6%, $n = 613$), normal-height controls (12.1%, $n = 340$), and overgrowth controls (4.8%, $n = 104$), indicating that this deletion represents a polymorphic copy number variant.

corresponding to a size of 273–294 kb (Fig. 2). Two unrelated ISS probands (probands 2 and 3), harboring a complete gene duplication, also appear to share the same 5' and 3' break points (Fig. 2).

Confirmation of duplications

SHOX copy number was confirmed by at least one alternative method, qPCR (probands 1–13, Fig. 2) and/or the observation of three alleles for one or more PAR1 microsatellite markers (probands 1, 3, 5, 6, 14, and 15, Fig. 2). The MLPA and qPCR data were concordant in 10 of 13 analyzed cases (Table 2) and differing in only one copy in two further cases (probands 8 and 9). Interestingly, three probands were observed, by MLPA and qPCR, to have multiple copies of the affected region (probands 8, 10, and 13; Table 2). Despite extensive optimization of the various techniques and multiple attempts and due to limitations of the quantification assays, the exact number of copies could not be determined for proband 13, which appeared to have the largest number of copies (5–18).

Fluorescence *in situ* hybridization

To investigate whether the extra copy/copies of *SHOX* were translocated to another chromosome, we undertook FISH analysis on metaphase chromosomes from probands 1, 4, 5, 8 (Supplemental Fig. 1), 12, and 13 and from both parents of proband 8 (Supplemental Fig. 1). No translocation was detected in any of the analyzed samples.

Discussion

We report on the largest collection of LWD or ISS cases associated with *SHOX* duplications or multiple copy number detected to date. For aiding the flow of reading, from this point on, we use the term *SHOX* duplications to include not only the 12 duplications but also the three cases that have multiple *SHOX* copies ($n > 3$). Four complete and 10 partial *SHOX* duplications as well as one duplication upstream of *SHOX* were detected in nine LWD and six ISS probands by MLPA and confirmed by

TABLE 2. *SHOX* copy number determination showing the comparison of qPCR and MLPA data

Proband	qPCR (5' <i>SHOX</i>)	qPCR (<i>SHOX</i> ex2)	qPCR (3' <i>SHOX</i>)	Average of duplicated qPCR	Average of duplicated MLPA probes	Number of copies
1	1.62	2.05	1.70	1.71	1.38	3
2	(1.33)	1.90	1.01	1.62	1.75	3
3	1.57	1.45	0.85	1.51	1.48	3
4	1.34	1.55	1.26	1.45	1.39	3
5	1.45	1.67	1.12	1.56	1.48	3
6	1.39	(1.32)	1.25	1.36	1.36	3
7	1.01	1.77	1.27	1.77	1.38	3
8	0.97	3.54	1.16	3.54	2.90	6–7
9	0.93	2.12	1.25	2.12	1.60	3–4
10	1.06	2.18	1.12	2.18	2.20	4
11	0.96	1.49	1.04	1.49	1.50	3
12	1.06	1.37	1.04	1.37	1.80	3
13	0.87	8.06	1.19	8.06	3.71	5–18 ^a
		(8.93, 7.19)			(2.51, 3.57, 5.07) ^b	

The qPCR amplicons with values above normal (*i.e.* more than two copies) are indicated in *bold*. Each qPCR was performed in duplicate and each assay was repeated twice. The test samples were normalized to the two copy GAPDH control gene. Each MLPA was repeated twice except for proband 13, which was repeated three times.

^a The number of copies cannot be finely determined due to the large variability and the sensitivity limits of the assays. No qPCR was undertaken in proband 14 due to lack of DNA and in proband 15 because the duplicated region did not encompass any of the three amplicons. No qPCR was undertaken for proband 15 because the duplication did not include any of the analyzed regions.

^b The average values of the qPCR and MLPA assays are shown for proband 13.

alternative methods. Importantly, no duplication was observed in 340 controls with normal height or 104 overgrowth referrals suggesting that they associate specifically with LWD or ISS.

SHOX duplications were identified in nine of 122 (7.3%) LWD and six of 613 (1.0%) ISS probands. No precise statistical analysis could be undertaken to compare frequencies between the LWD and normal height cohorts due to ascertainment bias and incomplete clinical data. Despite this and assuming the frequency of duplications to be equal in the normal population as the LWD/ISS cohort, we should have observed at least seven cases in the normal-height control cohort, if they would represent nonpathogenic copy number variants, and two in the overgrowth referrals, if they were associated with overgrowth.

When we compared the total number of duplications detected with the number of *PAR1* deletions, encompassing *SHOX* or its enhancers, or *SHOX* mutations detected in our LWD/ISS cohort, the incidence of *SHOX* or 5' flanking duplications compared with *PAR1* deletions was significantly lower (15 *vs.* 49), a finding that is consistent with recent studies regarding the incidence of segmental duplications in other disorders (31, 32, 34, 35). In our laboratory, the frequency of *PAR1* duplications is very similar to that of *SHOX* point mutations and indels (15 *vs.* 18).

Genotype/phenotype correlations

Partial *SHOX* duplications were more frequently associated with LWD (*n* = 8 probands) than ISS (*n* = 2). The heights of the LWD probands presenting with partial

SHOX duplications varied between −4.13 and −1.80 SDS, whereas the single LWD proband who presented with a complete *SHOX* duplication had normal stature (0.30 SDS). This variability is not unexpected because it is well documented that *SHOX* haploinsufficiency due to *SHOX* deletion/mutations exerts a widely variable effect on LWD patient's height (−5.6 to 0.3 SDS) (30–32, 33–35). Interestingly, all six unrelated probands presenting with the overlapping partial duplication of *SHOX* exons 2–6a presented with similar, LWD characteristic dysplastic features, and height SDS varied between −4.13 and −1.88. Although no definitive conclusion can be drawn from our present data, partial *SHOX* duplications appear to be more deleterious than complete *SHOX* duplications, resulting more often in the fully penetrant LWD rather than ISS, suggesting an underlying molecular mechanism also resulting in *SHOX* haploinsufficiency.

The first intrachromosomal *SHOX* duplication was described in a LWD proband (31, 33). Recently complete *SHOX* duplications were identified in five further individuals: two with LWD (19, 21), one with ISS (22), and two with Asperger syndrome (19) or cleft lip palate, respectively (19). A large duplication was also recently reported in a patient referred for mild mental retardation, congenital abnormalities, and dysmorphic features (20). In our cohort, mental retardation and dysmorphic facies were also reported in the clinical records of ISS proband 14.

Recent articles have reported the detection of *SHOX* duplications by subtelomeric MLPA assay in clinical re-

referrals unrelated with LWD or ISS (19, 20, 22). We reviewed the 745 clinical subtelomeric MLPA referrals that our diagnostic unit had carried out during the last 2 yr. Only two complete *SHOX* duplications were detected (0.27%). The first case was referred for behavioral disorders and psychomotor retardation. Both the proband and his unaffected carrier mother had normal heights, but no detailed auxological examination was undertaken. The second case identified was a prenatal referral due to the mother having a history of spontaneous abortions with cytogenetic aberrations.

Cosegregation analysis

Cosegregation of the duplication with the presence of short stature and Madelung deformity was apparent in three LWD families (probands 8, 11, and 12). LWD proband 8 inherited the allele with multiple partial *SHOX* copies from his mother, who shared classic clinical LWD features with her affected son, whereas the proband's brother, carrier of two normal *SHOX* alleles, has normal height, with an actual height SDS above the target height SDS (-0.66 vs. -2.83 SDS). We were unable to definitely determine cosegregation in six more LWD proband families (4, 6, 7, 9, 10, 11).

The increased copy number of *SHOX* exons 2–6a detected in proband 13 was not detected in genomic DNA extracted from his parents' lymphocytes suggesting that the multiple copies had either arisen *de novo* or germline mosaicism had occurred. Subsequently qPCR analysis was carried out on DNA extracted from a skin biopsy puncture sample from the affected mother. An increase in *SHOX* copy number was detected in the skin fibroblast DNA sample but absent in lymphocyte DNA, suggesting that somatic mosaicism had occurred. Although both mother and daughter presented with LWD, they show different degrees of affectation, the mother is shorter and has a milder form of Madelung deformity compared with her daughter. Analysis of a bone marrow sample from the mother would allow us to confirm this hypothesis.

Regarding the additional six ISS probands, although cosegregation is apparent in the family of probands 2 and 14, it could not be clearly demonstrated nor excluded in the families of probands 1, 3, and 15.

The assessment of cosegregation with the phenotype is often hampered in the absence of large families with a high number of affected and unaffected members. Furthermore, the large intra- and interfamilial phenotypic variability observed in LWD (9, 36) is an additional hurdle for the cosegregation analysis of these patients.

Pathogenic mechanism

We propose that the clinical manifestation associated with partial and complete *SHOX* duplications is dependent on the physical localization of the duplicated sequence.

With regard to the apparent association between *SHOX* partial or complete duplications and LWD/ISS, we hypothesize that *SHOX* expression from the allele harboring the duplication is reduced or ablated, resulting in *SHOX* haploinsufficiency and thus clinically manifesting as LWD or ISS. This may occur through at least three possible mechanisms: 1) the extra whole or partial copy/copies disrupt the normal copy of *SHOX* and the inserted copy/copies is/are not functional because they lack the necessary regulatory sequences; 2) the extra copy/copies is/are present in tandem with the normal copy, either affecting *SHOX* regulatory sequences or modifying the distance between the gene and the enhancers or regulatory sequences; and 3) the extra copy/copies is/are localized further upstream or downstream from the normal copy, which would increase the distance between the normal copy and the regulatory regions. This model is partially supported by our own observations, as illustrated by case 15 findings: although no *SHOX* coding sequence was affected by the 5' flanking duplication identified in proband 15, the duplication extended up to within 10–15 kb upstream of the *SHOX* promoters and may therefore have disrupted the interaction between the upstream enhancers and the *SHOX* promoters (37).

To be able to test these hypotheses, we should ideally analyze *SHOX* expression at the RNA and protein level in the bone marrow fibroblasts of these duplication carriers; however, none of the examined referrals have so far required surgical intervention.

In summary, the *SHOX*/PAR1 MLPA assay has proven to be an essential tool in the detection of copy number changes, including both deletions and now also duplications of *SHOX* or its flanking sequences in LWD/ISS referrals. Our results suggest that *SHOX* duplications may have an effect on human skeletal growth. We propose that an international registry should be initiated to further investigate the pathogenicity of PAR1 duplications encompassing *SHOX*. For this purpose, it would be essential to collect and document clinical and molecular data from not only the clinically affected but also their unaffected family members. This would help us to determine if *SHOX* duplications or increased *SHOX* copy number represent a novel class of mutations implicated in the molecular etiology of LWD and short stature.

Acknowledgments

We thank all the patients and the clinicians for participating in this study. We also thank M. R. C. Holland and Simon Thomas for their help and collaboration with the MLPA analysis.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Karen E. Heath, Instituto de Genética Médica y Molecular, Hos-

pital Universitario La Paz, P° Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. E-mail: kheath.hulp@salud.madrid.org.

This work was supported by grants from the “Fondo de Investigación Sanitaria” (Grants PI06/90364 and PI08/90270), “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (Grants SAF2006-00663 and SAF2009-08230) and the “Fundación Mutua Madrileña.” S.B.-S. is a recipient of a Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras postdoctoral fellowship.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Leri A, Weill J 1929 Une affection congenitale et symetrique du developpement osseux: la dyschondrosteose. Bull Mem Soc Med Hop (Paris) 53:1491
2. Langer Jr LO 1965 Dyschondrosteosis, a hereditary bone dysplasia with characteristic roentgenographic features. AJR Am J Roentgenol 95:178–188
3. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM on behalf of the 2007 ISS Consensus Workshop participants 2008 Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. J Clin Endocrinol Metab 93: 4210–4217
4. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekmans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V 1998 *SHOX* mutations in dyschondrosteosis (Léri-Weill syndrome). Nat Genet 19: 67–69
5. Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ, Winter RM 1998 Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Léri-Weill dyschondrosteosis. Nat Genet 19:70–73
6. Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barros A, Cormier-Daire V, Heath KE 2005 A novel class of pseudoautosomal region 1 (PAR1) deletions downstream of *SHOX* is associated with Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD). Am J Hum Genet 77:533–544
7. Fukami M, Okuyama T, Yamamori S, Nishimura G, Ogata T 2005 Microdeletion in the *SHOX* 3' region associated with skeletal phenotypes of Langer mesomelic dysplasia in a 45, X/46, X, r(X) infant and Léri-Weill dyschondrosteosis in her 46, XX mother: implication for the *SHOX* enhancer. Am J Med Genet A 137:72–76
8. Sabherwal N, Bangs F, Röth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, van der Kamp H, Kapeller J, Tickle C, Rappold G 2007 Long-range conserved non-coding *SHOX* sequences regulated expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. Hum Mol Genet 16:210–222
9. Benito-Sanz S, Gorbenko Del Blanco D, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, Argente J, Campos-Barros A, Heath KE 2006 PAR1 deletions downstream of *SHOX* are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. Hum Mutat 27:1062
10. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V; French *SHOX* GeNeSIS Module 2006 High incidence of *SHOX* anomalies in individuals with short stature. J Med Genet 43:735–739
11. Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, Rappold G 2009 Enhancer deletions of the *SHOX* gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. J Med Genet 46:834–839
12. Shears DJ, Guillen-Navarro E, Sempere-Miralles M, Domingo-Jimenez R, Scambler PJ, Winter RM 2002 Pseudodominant inheritance of Langer mesomelic dysplasia caused by a *SHOX* homeobox missense mutation. Am J Med Genet 110:153–157
13. Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott Jr CI, Marttila P, Ross JL 2002 Complete *SHOX* deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. Am J Med Genet 110:158–163
14. Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Ross JL, Zinn AR, Heath KE 2007 Compound heterozygosity of *SHOX*-encompassing and downstream PAR1 deletions results in Langer mesomelic dysplasia (LMD). Am J Med Genet A 143A:933–938
15. Bertorelli R, Capone L, Ambrosetti F, Garavelli L, Varriale L, Mazza V, Stanghellini I, Percesepe A, Forabosco A 2007 The homozygous deletion of the 3' enhancer of the *SHOX* gene causes Langer mesomelic dysplasia. Clin Genet 72:490–491
16. Adamson KA, Cross I, Batch JA, Rappold GA, Glass IA, Ball SG 2002 Trisomy of the short stature homeobox-containing gene (*SHOX*), resulting from a duplication-deletion of the X chromosome. Clin Endocrinol (Oxf) 56:671–675
17. Ogata T, Matsuo N, Nishimura G 2001 *SHOX* haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status. J Med Genet 38:1–6
18. Ogata T, Inokuchi M, Ogawa M 2002 Growth pattern and body proportion in a female with short stature homeobox-containing gene overdosage and gonadal estrogen deficiency. Eur J Endocrinol 147:249–254
19. Thomas NS, Harvey JF, Bunyan DJ, Rankin J, Grigeliuniene G, Bruno DL, Tan TY, Tomkins S, Hastings R 2009 Clinical and molecular characterization of *SHOX* duplications encompassing the human *SHOX* gene reveal a variable effect on stature. Am J Med Genet Part A 149A:1407–1414
20. Roos L, Brondum-Nielsen K, Turner Z 2009 A duplication encompassing the *SHOX* gene and the downstream evolutionarily conserved sequences. Am J Med Genet Part A 149:2900–2901
21. Iughetti L, Capone L, Elsedfy H, Bertorelli R, Predieri B, Bruzzi P, Forabosco A, El Kholy M 2010 Unexpected phenotype in a boy with trisomy of the *SHOX* gene. J Pediatr Endocrinol Metab 23:159–169
22. D'haene B, Hellemans J, Craen M, De Schepper J, Devriendt K, Fryns JP, Keymolen K, Debals E, de Klein A, de Jong EM, Segers K, De Paepe A, Mortier G, Vandesompele J, De Baere E 2010 Improved molecular diagnostics of idiopathic short stature and allied disorders: quantitative polymerase chain reaction-based copy number profiling of *SHOX* and pseudoautosomal region 1. J Clin Endocrinol Metab 95:3010–3018
23. Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, Pintor S, Morizio E, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Rinaldi MM, Scarano G, Concolino D, Giannotti A, Petreschi F, Anzellotti MT, Pomilio M, Chiarelli F, Tumini S, Palka G 2003 *SHOX* mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. J Med Genet 40:E11
24. Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Huber C, Thomas NS, Aza-Carmona M, Bunyan D, Maloney V, Argente J, Cormier-Daire V, Campos-Barros A, Heath KE 2006 Characterization of *SHOX* deletions in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) reveals genetic heterogeneity and no recombination hotspots. Am J Hum Genet 79: 409–414; author reply 414
25. Gatta V, Antonucci I, Morizio E, Palka C, Fischetto R, Mokini V, Tumini S, Calabrese G, Stuppia L 2007 Identification and characterization of different *SHOX* gene deletions in patients with Léri-Weill dyschondrosteosis by MLPA assay. J Hum Genet 52:21–7
26. Barroso E, Benito-Sanz S, Belinchón A, Yuste-Checa P, Gracia R, Aragones A, Campos-Barros A, Heath KE 2010 Identification of the first *de novo* PAR1 deletion downstream of *SHOX* in an individual diagnosed with Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD). Eur J Med Genet 53:204–207
27. Funari MF, Jorge AA, Souza SC, Billerbeck AE, Arnhold JJ, Mendonça BB, Nishi MY 2010 Usefulness of MLPA in the detection of *SHOX* deletions. Eur J Med Genet 53:234–238
28. Sobradillo B, Aguirre A, Aresti U, Bilbao A, Fernández-Ramos C, Lizárraga A, Lorenzo H, Madariaga L, Rica I, Ruiz I, Sánchez E, Santamaría C, Serrano JM, Zabala A, Zurimendi B, Hernández M

- 2002 Curvas y tablas de crecimiento (estudios longitudinal y transversal). Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre Bilbao; 1–36
29. Pinkel D, Straume T, Gray JW 1986 Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938
 30. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA 1997 Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16:54–63
 31. Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME 2008 Germline rates of *de novo* meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet* 40:90–95
 32. Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR 2009 Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 25:298–307
 33. Grigeliuniene G, Schoumans J, Neumeyer L, Ivarsson A, Eklöf O, Enkvist O, Tordai P, Fosdal I, Myhre AG, Westphal O, Nilsson NO, Elfving M, Ellis I, Anderlid BM, Fransson I, Tapia-Paez I, Nordenskjöld M, Hagenäs L, Dumanski JP 2001 Analysis of short stature homeobox-containing gene (*SHOX*) and auxological phenotype in dyschondrosteosis and isolated Madelung deformity. *Hum Genet* 109:551–558
 34. Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadopoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T 2002 Deletions of the homeobox gene *SHOX* (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1402–1406
 35. Binder G, Renz A, Martinez A, Keselman A, Hesse V, Riedl SW, Häusler G, Fricke-Otto S, Frisch H, Heinrich JJ, Ranke MB 2004 *SHOX* haploinsufficiency and Léri-Weill dyschondrosteosis: prevalence and growth failure in relation to mutation, sex, and degree of wrist deformity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4403–4408
 36. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B 2007 Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of *SHOX* haploinsufficiency. *J Med Genet* 44:306–313
 37. Durand C, Bangs F, Signolet J, Decker E, Tickle C, Rappold G 2010 Enhancer elements upstream of the *SHOX* gene are active in the developing limb. *Eur J Hum Genet* 18:527–532



You can post your CV, post an open position
or look for your next career opportunity
in the targeted **Career Services site.**

www.endo-society.org/placementservices